

ANA CAROLINE QUALLIO MARQUES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
HUMANOS E AMBIENTAIS DE *Herbaspirillum spp.***

Dissertação apresentada como requisito parcial á obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth

Co-Orientadora: Profª Drª Fabiane Rego

CURITIBA

2011

Marques, Ana Caroline Quallio

Caracterização fenotípica e molecular de isolados humanos e ambientais de *Herbaspirillum* spp. / Ana Caroline Quallio Marques – Curitiba, 2011.

96 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth

Co-Orientadora: Professora Dra. Fabiane Rego

Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Herbaspirillum* spp. 2. Patógenos 3. Infecções Oportunistas
I. Fadel-Picheth, Cyntia Maria. II. Rego, Fabiane. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.014

“ Deus sabe o que é melhor para cada um de nós, por isso, fazer a sua vontade é encontrar a felicidade.”

Pe. Leo, SCJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus todas as oportunidades que tenho recebido. Em especial esta, que agora compartilho com todos aqueles que viveram, choraram e vibraram comigo cada instante vivido nestes dois últimos anos.

À Universidade Federal do Paraná, agradeço à oportunidade de cursar esta pós-graduação e as dispensas de expedientes para desenvolvimento de experimentos, participação de aulas e eventos científicos.

Agradeço as minhas orientadoras Prof.^a Dr.^a Cyntia e Prof.^a Dr.^a Fabiane, pela oportunidade, confiança, paciência e por todos os ensinamentos que permitiram a construção deste trabalho. Agradeço também pela presença, amizade e apoio dentro e fora do laboratório.

Às meninas do laboratório, minhas companheiras de bancada e amigas Carol Tanaka, Cibelle, Cristina, Fagna, Flávia, Suélen e Mônica muito obrigada pela companhia, companheirismo e descontração.

Ao Prof. Dr. John LiPuma, do departamento de Pediatria da Universidade de Michigan, agradeço pelo envio das estirpes clínicas.

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica, da UFPR, agradeço o apoio técnico, estrutural e científico. Agradeço particularmente ao Prof. Dr. Leonardo, pelo envio das estirpes ambientais assim como pelas demais contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Kátia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos experimentos “in vitro”, ensinamentos, otimismo e dinamismo.

À minha família agradeço pela compreensão nos momentos de minha ausência, pelo carinho e acolhimento que recebi durante este período. Em especial agradeço meus pais Juliano e Teresinha pelo apoio para o início deste mestrado, por incentivar, planejar e sonhar comigo esta construção. Ao meu avô Juliano, que por ter sido um homem de visão, mudou a história de sua família. Aos meus irmãos Cristiane, Nelson e Francisco que por serem tão diferentes uns dos outros ajudam maravilhosamente no tempero desta família. E ao meu amado esposo Devair por encher minha vida de amor e alegria, estar ao meu lado vencendo obstáculos e construindo a família que Deus sonhou para nós.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 BIOTECNOLOGIAS EM AGRICULTURA E MICROORGANISMOS	
FIXADORES DE NITROGÊNIO	14
2.2 RIZOSFERA E MICROORGANISMOS	15
2.2.1 Rizosfera e bactérias oportunistas	16
2.3 <i>HERBASPIRILLUM</i> SPP.	17
2.3.1 <i>H. frisingense</i>	18
2.3.2 <i>H. hiltneri</i>	19
2.3.3 <i>H. huttiense</i>	20
2.3.4 <i>H. lusitanum</i>	20
2.3.5 <i>H. putei</i>	21
2.3.6 <i>H. rubrisulbalbicans</i>	21
2.3.7 <i>H. seropedicae</i>	22
2.3.8 Microorganismos do gênero <i>Herbaspirillum</i> como patógenos humanos.	23
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS	25
2.4.1 Identificação de microorganismos através de testes microbiológicos	
convencionais.....	25
2.4.2 Identificação de microorganismos através de sequenciamento de DNA.	27
2.4.3 Identificação de microorganismos por MALDI-TOF MS	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.1.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 AMOSTRA.....	31
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM DE BACTÉRIAS.....	31
4.3. TESTES FENOTÍPICOS	32
4.3.1 Testes microbiológicos convencionais	32
4.3.2 Teste fenotípico – BIOLOG®	33
4.3.3 Ensaio da Nitrogenase	33
4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	34
4.4.1 Sequenciamento de DNA	34
4.4.1.1 Extração de DNA.....	34
4.4.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase	35
4.4.1.3 Detecção dos produtos de PCR	35
4.4.1.4 Purificação dos produtos de PCR	35
4.4.1.5 Reação de Sequenciamento	36
4.4.2 Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	37
4.4.2.1 Preparo da Amostra	37
4.4.2.2 Análise das amostras	37
4.4.2.3 Análise dos espectros	38
4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”	38
4.5.1 Ensaio de adesão celular utilizando células HeLa	38
4.5.2 Determinação do potencial citotóxico das estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sobre	
a linhagem celular Vero.....	39
4.5.3 Determinação da produção de hemolisina	40
4.5.4 Análises estatísticas	41
5. RESULTADOS.....	42

5.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	42
5.1.1 Testes microbiológicos convencionais	42
5.1.2 Teste microbiológico comercial Biolog®.....	46
5.1.3. Ensaio da Nitrogenase	49
5.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	50
5.2.1 Sequenciamento do gene <i>gyrB</i> de isolados humanos de <i>Herbaspirillum</i>	50
5.2.3 Espectrometria de massa MALDI-TOF.....	54
5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”	65
5.3.1 Ensaio de adesão celular utilizando células HeLa	65
5.3.2 Avaliação do potencial citotóxico de <i>Herbaspirillum</i> sobre a linhagem celular Vero	73
5.3.3 Verificação da produção de hemolisina.....	74
6.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	77
6.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	84
6.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”	86
7. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA	- Gene codificador do RNA ribossomal 16S
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BGN-NF	- Bacilo gram negativo não fermentador
CLED	- Cistina Lactose Eletrólitos Deficiente
DNA	- Ácido Desoxiribonucléico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
MALDI-TOF MS	- <i>Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazólio)
ONPG	- orto- nitrofenil- β -galactosídeo
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i>
pb	- Pares de base
SAP	- <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
TBE	- Tris/Borato/EDTA
TSA	- Agar triptona de Soja
TSB	- Caldo triptona de soja
TSI	- <i>Triple sugar iron</i>
TGY	- Triptona glucose extrato de levedura
RNA	- Ácido Ribonucléico
RFLP	- <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
rpm	- Rotações por minuto
rpoB	- Gene codificador da subunidade β da RNA polimerase
gyrB	- Gene codificador da subunidade β da DNA girase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS AMPLICONS DAS ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> ISOLADAS DE HUMANOS COM A SEQUÊNCIA CORRESPONDENTE DA ESTIRPE DE <i>H. seropedicae</i> Smr1 DISPONÍVEL NO GENBANK (NÚMERO DE ACESSO CP002039.1). Os asteriscos indicam posições com nucleotídeos idênticos.....	53
FIGURA 2: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> Z67, Smr1 e AV 14040.....	59
FIGURA 3: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES <i>H. putei</i> IAM 15032, AV 13384, e <i>H. lusitanum</i> P6-12.....	60
FIGURA 4: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES <i>H. huttiense</i> IAM 14941, AV 11883 e <i>H. rubrisulbalbicans</i> M4.....	61
FIGURA 5: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES <i>H. frisingense</i> GSF-30, AV 14559 e <i>H. hiltneri</i>	62
FIGURA 6: ESPECTRO DE MASSAS DAS ESTIRPES <i>Herbaspirillum</i> linhagem 1 (AV 14775), <i>Herbaspirillum</i> linhagem 2 (AV 13965) e <i>Herbaspirillum</i> linhagem 3 (AV 3926).....	63
FIGURA 7: DENDROGRAMA GERADO COM OS RESULTADOS DE MALDI-TOF DAS ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> spp. ESTIRPES: HILT1: <i>H. hiltneri</i> , P6-12: <i>H. lusitanum</i> , AV 13384: <i>H. putei</i> , Smr1: <i>H. seropedicae</i> , AV 14040: <i>H. seropedicae</i> , Z67: <i>H. seropedicae</i> , IAM 15032: <i>H. putei</i> , IAM 14941: <i>H. huttiense</i> , AV 14775: <i>H. linhagem 1</i> , AV 11883: <i>H. huttiense</i> , AV 3926: <i>H. linhagem 3</i> , M4: <i>H. rubrisulbalbicans</i> , AV 13965: <i>H. linhagem 2</i> , AV 14559: <i>H. frisingense</i> , GSF-30: <i>H. frisingense</i>	64
FIGURA 8: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>Herbaspirillum</i> linhagem 3 (AV 3926), <i>H. huttiense</i> (AV 11883); <i>H. putei</i> (AV 13384). FONTE: O AUTOR, 2011.	66
FIGURA 9: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>Herbaspirillum</i> linhagem 2 (AV 13965), <i>H. seropedicae</i> (AV 14040), <i>H. frisingense</i> (AV 14559). FONTE: O AUTOR, 2011.....	67
FIGURA 10: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>H. frisingense</i> (AV 14559) e <i>Herbaspirillum</i> linhagem 1 (AV 14775).....	68
FIGURA 11: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>H. frisingense</i> (GSF-30) e <i>H. hiltneri</i>	69
FIGURA 12: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>H. putei</i> (IAM 15032) e <i>H. lusitanum</i> (P6-12).....	70
FIGURA 13: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>H. rubrisulbalbicans</i> (M4) e <i>H. seropedicae</i> (Smr1).	71
FIGURA 14: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES <i>H. seropedicae</i> (Smr1) e <i>H. seropedicae</i> (Z67).....	72
FIGURA 15: ENSAIO PARA AVALIAR O POTENCIAL DE CITOTOXIDADE DE ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> SOBRE CÉLULAS Vero. A presença de células viáveis é inferida pela metabolização do MTT gerando formazan que é quantificado por espectrofotometria em 570 nm. As barras indicam o desvio padrão.....	73
FIGURA 16: ENSAIO DE HEMÓLISE REALIZADO COM ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> . A figura indica poços de placas de microtitulação contendo os sobrenadantes das misturas de eritrócitos humanos com <i>Herbaspirillum</i> spp após 2 horas de incubação. Os números 6, 18 e 24 indicam os tempos nos quais alíquotas de cultivos de <i>Herbaspirillum</i> foram coletadas para a realização do ensaio. Ctrl:-	

sobrenadante da incubação de eritrócitos com meio de cultivo bacteriano (TSB) apenas. Ctrl+: sobrenadante da incubação dos eritrócitos com meio de cultivo bacteriano (TSB) e 0,1% de Triton X-100.	75
FIGURA 17: ENSAIO DE HEMÓLISE REALIZADO COM ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> . O gráfico mostra leituras de absorbância em 550 nm do sobrenadante da reação. As barras indicam o desvio padrão.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> spp.	31
TABELA 2 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONAIS.	43
TABELA 3 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> NO PAINEL Biolog® GN2.....	46
TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DISPONÍVEIS NO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM AS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE <i>Herbaspirillum</i> spp.....	50
TABELA 5 - RELAÇÃO MASSA CARGA (M/Z) DOS PICOS OBTIDOS DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS DE <i>Herbaspirillum</i> spp* ..	55

RESUMO

Microorganismos pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* têm sido amplamente estudados em relação à sua capacidade de fixar nitrogênio. Contudo o crescente isolamento destes microorganismos a partir de amostras clínicas indica o potencial para atuar como patógeno humano. Neste trabalho 15 estirpes de *Herbaspirillum*, oito isolados ambientais e sete isolados clínicos, foram estudadas quanto às suas características fenotípicas, moleculares e comportamento em ensaios biológicos “in vitro”. Os resultados dos testes microbiológicos convencionais indicam que as bactérias do gênero *Herbaspirillum* poderiam ser erroneamente identificadas como *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia monolytica*, *Ochobacterium spp.*, *Acidovorox spp.* ou o grupo 2 *Pseudomonas*-like. Divergências nos resultados de alguns dos testes bioquímicos comuns aos sistemas convencionais e comerciais foram observadas. Nenhuma das estirpes isoladas de humanos foi capaz de fixar nitrogênio. O sequenciamento do gene *gyrB*, realizado apenas para as estirpes isoladas de humanos, confirmam a classificação destes microorganismos no gênero *Herbaspirillum*, realizada previamente pela análise de 16S *rRNA*. As análises de espectrometria de massa tipo MALDI-TOF permitiram identificar os picos (*m/z*) 3349,46 (3347,97-3351,38) e 6700,78 (6697,92-6702,3) comuns entre as 15 estirpes do gênero estudadas e um pico de 7313,47 (7311,92-7315,02) em comum para ambas as estirpes de *H. frinsingense*, que podem servir como marcadores para esse gênero e espécies. As análises de MALDI-TOF permitiram a identificação ao nível de espécie e estirpe, e são mais vantajosas e acuradas em relação aos ensaios bioquímicos. Os ensaios biológicos “in vitro” demonstraram que, nas condições utilizadas, as estirpes não apresentam ação citotóxica nem hemolítica, embora tenham sido capazes de aderir às células humanas. Os resultados obtidos indicam que as estirpes ambientais e clínicas são similares na grande maioria das características testadas, mas foram claramente distinguidas através da análise de MALDI-TOF, que pode eventualmente vir a ser a metodologia de referência para a identificação desses organismos. Os ensaios celulares sugerem que as estirpes de *Herbaspirillum* apresentam baixo potencial de virulência.

ABSTRACT

Microorganisms belonging to the genus *Herbaspirillum* have been widely studied in relation to their ability to fix nitrogen. However the increasing isolation of these microorganisms from clinical samples indicates their potential to act as a human pathogens. In these study the phenotypic characteristics and molecular behavior in biological assays in vitro of 15 strains of *Herbaspirillum*, eight environmental isolates and seven clinical isolates, were analyzed. Results of the conventional microbiological tests indicated that bacteria of the genus *Herbaspirillum* may be misidentified as *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia monolytica*, *Ochobacterum spp.*, *Acidovorox spp.* or *Pseudomonas*-like group 2. Discrepancies in the results of some biochemical tests common to conventional and commercial systems were observed. None of the strains isolated from humans were able to fix nitrogen. Sequencing of the *gyrB* gene, performed only for strains isolated from humans, confirmed the classification of these microorganisms in the genus *Herbaspirillum*, which was previously performed by analysis of 16S rRNA. The analysis based on MALDI-TOF mass spectrometry allowed to identify the peaks (m/z) 3349,46 (3347,97-3351,38) e 6700,78 (6697,92-6702,3) common for the 15 strains studied and one peak in 7313,47 (7311,92-7315,02) common for both strains of *H. frinsingense*, which may serve as markers for this genus and species. The MALDI-TOF analysis allowed the identification to species and strain level, and is more advantageous and accurate in relation to biochemical assays for this group of bacteria. Biological assays in vitro demonstrated that, in the conditions used, strains presented no cytotoxic or hemolytic activities, although they were able to adhere to human cells. The results indicate that the environmental and clinical strains were similar in most tests, but were clearly distinguished by analysis of MALDI-TOF, which may eventually become the reference methodology for the identification of organisms. The cellular assays suggested that the *Herbaspirillum* strains have low virulence potential.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de microorganismos fixadores de nitrogênio em plantas de interesse agrícola é reconhecida por reduzir custos de produção bem como por ser uma alternativa de menor impacto ao meio ambiente (SILVEIRA *et al.*, 2004).

Dentre os diferentes microorganismos capazes de promover a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, pode se destacar algumas bactérias pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, que vêm sendo amplamente estudadas quanto aos benefícios potenciais de seu uso agrícola. Contudo, o isolamento de *Herbaspirillum* a partir de amostras clínicas, especialmente de pacientes imunocomprometidos (SPILKER *et al.*, 2008), levanta questionamentos quanto à semelhança entre as estirpes isoladas de humanos e aquelas encontradas associadas à vegetais e, em especial, quanto ao potencial de patogenicidade das últimas em humanos.

Considerando a importância dos patógenos oportunistas nas pessoas que realizam tratamento com drogas imunossupressoras, naquelas que apresentam doenças imunossupressoras ou defesa reduzida no combate a microorganismos, e ainda patologias de base predisponentes para o desenvolvimento de infecções, este projeto visa o estudo fenotípico e molecular de estirpes de *Herbaspirillum* isoladas de humanos e do ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOTECNOLOGIAS EM AGRICULTURA E MICROORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO

A aplicação da biotecnologia (manipulação de seres vivos ou parte destes para produzir bens e serviços) na agricultura pode ser considerada um marco para a evolução agrícola. A inovação de técnicas agrícolas e o aumento da produtividade nessa área estão cada vez mais relacionados ao conhecimento científico derivado da aplicação de técnicas moleculares e celulares do que às inovações mecânicas e químicas. Além disso, esta prática vem acompanhada de expectativas de melhorias na qualidade dos alimentos, redução de custos e desenvolvimento de práticas agrícolas de menor impacto ambiental (SILVEIRA *et al.*, 2004).

O Brasil é um dos principais centros de pesquisa agrícola entre os países em desenvolvimento, e conta com diversas instituições públicas de ensino e pesquisa voltadas para o desenvolvimento da biotecnologia, seja atuando no melhoramento de vegetais, controle biológico de pragas ou fixação biológica de nitrogênio (SILVEIRA *et al.*, 2004).

O nitrogênio é um elemento fundamental para o desenvolvimento das plantas, e encontra-se disponível em alta concentração na atmosfera (~ 80%), na forma gasosa (N_2). A disponibilidade de nitrogênio influencia de maneira positiva a produtividade das culturas agrícolas, contudo as plantas realizam a assimilação do nitrogênio somente na forma de amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-), que são incorporados para formar aminoácidos e outros compostos. Algumas bactérias, denominadas diazotróficas ou fixadoras de N_2 , são capazes de realizar a conversão do nitrogênio gasoso em amônia através do processo de fixação biológica de nitrogênio (DÖBEREINER, 1997; SILVEIRA e FREITAS, 2007), que é conduzido pela enzima nitrogenase (DIXON e KAHN, 2004).

A fixação biológica do nitrogênio traz vantagens econômicas e ambientais significativas, visto que é conhecido o impacto do uso de fertilizantes químicos em ambos os aspectos. As bactérias diazotróficas encontram-se associadas com plantas de interesse econômico, ecológico e alimentar como as leguminosas (soja, feijão), leguminosas forrageiras e de reflorestamento, e as não leguminosas, em

especial as gramíneas (cana de açúcar, milho, arroz, sorgo) (DÖBEREINER, 1997; SILVEIRA, *et al.* 2004; ALVES *et al.*, 2006).

2.2 RIZOSFERA E MICROORGANISMOS

Dá-se o nome de rizosfera à região do solo influenciada pelo metabolismo das raízes das plantas. Esta é uma região rica em exsudatos, secreções e fragmentos celulares advindos da raiz. Estes compostos incluem água, ácidos orgânicos, ácidos graxos, esteróis, fatores de crescimento, nucleosídeos, açúcares, aminoácidos e vitaminas, o que torna esta uma região rica em nutrientes. Ela desempenha importante papel nos ciclos de nutrientes assim como na manutenção da saúde e estímulo do crescimento da planta (BERG *et al.*, 2005; BAIS *et al.*, 2006; NEHL e KNOX, 2006; SILVEIRA e FREITAS, 2007).

A rica composição do meio, aliada a condições favoráveis de pH e de potencial redox proporcionam um nicho favorável para presença de microorganismos. Neste ambiente ocorrem interações complexas entre os microorganismos e a planta, assim como entre os microorganismos, que competem entre si pelos nutrientes ali ofertados (WHIPPS, 2001; BERG *et al.*, 2005; BAIS *et al.*, 2006; TYLER e TRIPLETT, 2008).

As bactérias que habitam a rizosfera (rizobactérias) encontram-se distribuídas na superfície das raízes em vida livre (organismos rizosféricos), e associadas aos tecidos internos das plantas (bactérias endofíticas) (DÖBEREINER, 1997). A associação entre bactérias e as raízes das plantas tem sido amplamente estudada e nela estão envolvidos diversos gêneros bacterianos assim como diversas plantas, dentre elas vegetais de importância agrícola como as gramíneas. As rizobactérias podem influenciar de maneira positiva ou negativa o crescimento do vegetal. No primeiro caso elas recebem a denominação de rizobactérias promotoras do crescimento enquanto no segundo rizobactérias deletérias. As promotoras do crescimento atuam por diversos mecanismos entre eles a produção de fitohormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos e supressão do crescimento de microorganismos patogênicos. As rizobactérias deletérias inibem o crescimento da planta através da produção de

fitotoxinas como o ácido cianídrico (HCN). Algumas rizobactérias podem atuar como promotoras ou deletérias de acordo com as condições do meio, população de microorganismos e genoma da planta (NEHL e KNOX, 2006).

O ambiente da rizosfera estimula também a transferência de genes entre os microorganismos, levando uma alta taxa de recombinação gênica (BERG *et al.*, 2005). A incorporação de DNA livre no meio, transferência de plasmídeos e de elementos transponíveis, podem trazer novas informações genéticas e assim promover alteração das características fenotípicas das rizobactérias (NEHL e KNOX, 2006). As interações entre os microorganismos estimulam o aparecimento de estirpes produtoras de antibióticos, estirpes multiresistentes e estirpes capazes de produzir toxinas prejudiciais a microorganismos eucarióticos. Em muitos casos as espécies capazes de produzir substâncias com atividade antibiótica previnem a infecção por fitopatógenos e protozoários (WHIPPS, 2001; BERG *et al.*, 2005). Em contra partida algumas das espécies capazes de produzir substâncias prejudiciais a microorganismos eucarióticos podem também atuar como fitopatógenos ou patógenos humanos oportunistas (BERG *et al.*, 2005).

A junção de fatores como a densidade de microorganismos, a disponibilidade de nutrientes, alta taxa metabólica, e condições favoráveis para recombinação gênica, torna a rizosfera um ambiente favorável para a seleção de espécies patógenas humanas facultativas (BERG *et al.*, 2005).

2.2.1 Rizosfera e bactérias oportunistas

A patogenicidade de um microorganismo relaciona-se com a capacidade de causar doença no hospedeiro (FINLAY e FALKOW, 1989; ERLICH *et al.*, 2008). Ela depende da capacidade que o microorganismo possui para penetrar, multiplicar-se e esquivar-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro (FINLAY e FALKOW, 1989). Estes fatores, por sua vez, não dependem unicamente das informações genéticas do microorganismo, mas também da predisposição do hospedeiro e de condições ambientais favoráveis (ERLICH *et al.*, 2008). Desta maneira, a probabilidade de causar dano ao hospedeiro é variável. Enquanto alguns microorganismos são

capazes de afetar hospedeiros hígidos outros só serão capazes de causar doença em imunossuprimidos (FINLAY e FALKOW, 1989).

Bactérias oportunistas também denominadas patogênicas facultativas são caracterizadas por provocar doença em pacientes debilitados, imunocomprometidos, ou que apresentam outra patologia de base, como por exemplo: a Aids e a Fibrose Cística, que levam o paciente a um quadro progressivo de imunossupressão. Estes microorganismos podem estar presentes na água, no solo, ou ainda ser comensais de outros organismos mais complexos como os animais e as plantas. Neste contexto a rizosfera apresenta-se como um potencial reservatório de bactérias oportunistas (BERG *et al.*, 2005).

Estudos acerca da intensa interação entre organismos eucarióticos e procarióticos presentes na rizosfera demonstram similaridade entre os genes responsáveis pelos mecanismos de colonização de hospedeiros eucariotos, em bactérias promotoras do crescimento vegetal, e bactérias patogênicas (TYLER e TRIPLETT, 2008). Também há similaridade entre genes relacionados à patogenicidade de bactérias patogênicas de plantas e animais. Entre eles podem ser citados os genes relacionados à maquinaria que compõe o sistema de secreção tipo III (BÜTTNER e BONAS, 2003; TYLER e TRIPLETT, 2008). Similaridade entre o genoma dos microorganismos patogênicos e ambientais tem sido descrita sugerindo que a diferença entre as estirpes pode estar na regulação dos genes de virulência, e que alguns mecanismos que viabilizam uma interação benéfica entre plantas e bactérias, são similares ou até mesmo idênticos aos mecanismos de virulência envolvidos na interação entre bactéria e o organismo humano (BERG *et al.*, 2005).

2.3 *Herbaspirillum* spp.

Membro da classe β -*Proteobacteria* e da família *Oxalobacteraceae* o gênero *Herbaspirillum* contém bactérias gram negativas, de forma vibrióide ou helicoidal, não fermentadoras de açúcares e móveis. Podem apresentar de um a três flagelos em uma ou ambas as extremidades das células (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996; BALDANI *et al.*, 2005).

São positivos para as provas de oxidase e urease, contudo variáveis (podendo ser fracamente positivos) para a prova de catalase. Quando em condições

de microaerofilia algumas das espécies são capazes de fixar N₂ atmosférico, ou seja, são capazes de crescer em condições onde a única fonte de nitrogênio é N₂. Utilizam preferencialmente como fonte de carbono sais orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato e citrato, podendo também utilizar outras fontes como o glicerol, manitol, D-glucose e o sorbitol. Em meio JNFb contendo azul de bromotimol, apresentam colônias planas, lisas e brancas com centros azul ou verde após uma semana de incubação (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996).

Atualmente estão descritas as seguintes espécies (EUZÉBY, 2011): *H. aquaticum* (DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. autotrophicum* (ARAGNO e SCHLEGEL, 1978; DING e YOKOTA, 2004), *H. hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006), *H. huttiense* (LEIFSON, 1962; DING e YOKOTA, 2004); *H. chlorophenolicum* (IM *et al.*, 2004); *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001); *H. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2003); *H. putei* (DING e YOKOTA, 2004); *H. rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007); *H. rubrisubalbicans* (CHRISTOPHER e EDGERTON, 1930; BALDANI *et al.*, 1996) e *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986).

A maior parte dessas bactérias está associada à colonização endofítica de raízes, caules e folhas de gramíneas, são fixadoras de nitrogênio e não parecem estar associadas a doenças. Entretanto já foram descritas espécies isoladas de amostras de água e fluidos de hemodiálise, espécies fitopatogênicas e estirpes isoladas a partir de amostras clínicas associadas com infecções em humanos (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1997, KIRCHHOF *et al.*, 2001; GOMILA *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006; COENYE *et al.*, 2002).

2.3.1 *H. frisingense*

Esta espécie foi identificada por Kirchhof e colaboradores em 2001, durante o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio dos vegetais *Miscanthus* spp (Alemanha), *Spartina pectinata* (Alemanha) e *Pennisetum purpureum* (Brasil). Bactérias desta espécie são encontradas em associação com raízes, caules e folhas de gramíneas (KIRCHHOF *et al.*, 2001), são endofíticas, e promovem o crescimento

do vegetal através da secreção de fitohormônios (ROTHBALLER *et al.*, 2008). São bacilos gram negativos móveis, curvos, delgados, em forma espiralada, com um a três flagelos unipolares. Suas células possuem diâmetro entre 0,5 e 0,7 μm e comprimento entre 1,4 e 1,8 μm . A temperatura ótima de crescimento, em presença de nitrogênio, está na faixa de 30 e 37°C e o pH entre 6,0 a 7,0; o conteúdo de guanina e citosina é de 63% (KIRCHHOF *et al.*, 2001).

Assim como as demais espécies do gênero, são microorganismos de metabolismo oxidativo que utilizam preferencialmente ácidos orgânicos como fonte de carbono. São incapazes de metabolizar di e tri-sacarídeos, porém capazes de metabolizar aminoácidos e ácidos graxos. São positivos para as provas de catalase, oxidase e urease, contudo negativos para hidrólise de gelatina. Promovem a redução de nitrato a nitrito, porém não reduzem nitrito a gás N_2 (KIRCHHOF *et al.*, 2001).

Possuem genes *nif*, e fixam nitrogênio em condições de microaerofilia. (KIRCHHOF *et al.*, 2001).

2.3.2 *H. hiltneri*

Estes microorganismos foram isolados inicialmente de raízes de trigo, apresentam tamanho entre 1,6 e 2,0 μm e diâmetro de 0,5 a 0,6 μm . Possuem flagelos polares, geralmente dois, e temperatura de crescimento ótimo entre 26 e 34°C. Não possuem genes *nifD* e *nifH* e portanto não são capazes de fixar nitrogênio (ROTHBALLER *et al.*, 2006).

Cresce utilizando ácido acético, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido D-glucônico, ácido succínico, glicogênio, L-arabinose, D-manitol, D-sorbitol, glicerol, mas não em N-acetil-D-galactosamina, D-cellobiose, gentiobiose, D-lactose, lactulose, maltose, D-melibiose, D-raffinose, sucrose, turanose, L-histidina, L-ornitina, glucose 1-phosphato, D-frutose, D-manose, L-rhamnose.

O sequenciamento do gene 16S *rRNA* levou à identificação inicial dessas bactérias como *H. lusitanum*, mas após a análise da região 23S *rRNA* as estirpes foram classificadas como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum*. Poucos

estudos adicionais foram realizados até o momento com estirpes deste gênero (ROTHBALLER *et al.*, 2006).

2.3.3 *H. huttiense*

Inicialmente identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas* (*[P.] huttiense*, LEIFSON, 1962) a espécie *H. huttiense* foi reclassificada em 2004 pelo trabalho de Ding (2004), que através de análise filogenética (16s rRNA) e hibridização de DNA, demonstrou maior similaridade da espécie como o gênero *Herbaspirillum* (DING e YOKOTA, 2004).

A espécie, assim como as demais pertencentes a este gênero, é gram negativa. Os organismos apresentam tamanho médio de 0,4 µm de diâmetro e 1,8 µm de comprimento, podendo ser levemente curvos e geralmente apresentam de um a três flagelos em ambos os pólos (LEIFSON, 1962; DING e YOKOTA, 2004).

São microrganismos aeróbios que produzem ácido a partir da glucose e xilose, e fracamente da manose e sorbitol. Não produzem ácido a partir da sacarose, maltose, lactose, rafinose. São negativos nos ensaios de amido, gelatina, celulose, nitrato e catalase (LEIFSON, 1962).

O teor de guanina e citosina é de 63,3 mol%. As estirpes não são capazes de fixar nitrogênio, nem possuem genes *nifH* (DING e YOKOTA, 2004).

2.3.4 *H. lusitanum*

Descrita por Valverde e colaboradores (2003), durante o isolamento de bactérias presentes em nódulos de raízes de feijão em Portugal, esta espécie possui de um a dois flagelos polares, tamanho médio de 1,6 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro. São capazes de fixar nitrogênio e o conteúdo de G+C é de 59,9 ± 2 mol%.

As estirpes pertencentes a esta espécie são capazes de crescer entre 20 e 35°C, assimilam D- glucose, manose, manitol, gluconato, caprato, malato, citrato,

fenilacetato, N-acetil D-glucosamina, L-ramnose, arabinose. Apresentam reações negativas para maltose, adipato, ONPG, meso-inositol, meso-eritritol, redução de nitrato a nitrito e indol (VALVERDE *et al.*, 2003).

2.3.5 *H. putei*

Isolada pela primeira vez de amostras de água, em Okasaka, Japão, a espécie *H. putei* compreende células em forma bacilos curvos ou em forma espiralada, imóveis, não formadoras de esporos. O tamanho médio varia entre 0,5 e 0,7 μm de diâmetro e 1,4 e 1,8 μm de comprimento. Suas condições ótimas de crescimento estão entre 25 e 37°C e pH entre 6,0 e 7,0. São positivos para as provas de catalase, oxidase, redução de nitrito e oxidação de D-glucose, arabinose, manitol, galactose, glicerol. Negativos para as provas de nitrato, lactose, maltose, sacarose, frutose, manose, L-ornitina, ramnose, trealose, L-fenilalanina (DING e YOKOTA, 2004; ROTHBALLER *et al.*, 2006).

Apesar de possuir genes *nifH*, não demonstra ser capaz de fixar nitrogênio atmosférico. Seu conteúdo de G+C é de 66,9 mol% (DING e YOKOTA, 2004).

2.3.6 *H. rubrisulbalbicans*

Classificado inicialmente como pertencente ao gênero *Pseudomonas* (CHISTOPHER e EDGERTON, 1930), a espécie foi reclassificada no gênero *Herbaspirillum* por Baldani e colaboradores, em 1996.

Apresentam múltiplos flagelos polares, temperatura ótima de crescimento a 30°C, sendo capazes de crescer a 40°C. Não produzem H_2S , não hidrolisam gelatina nem tween 80. A maior parte das estirpes é capaz de reduzir nitrato a nitrito. São positivos para as provas de D-glucose, glicerol, arabinose, lactose, manitol, D-frutose, D-galactose, sorbitol e negativos para as provas de sacarose, rafinose, salicina, maltose, celobiose e meso-inositol (BALDANI *et al.*, 1996).

As estirpes pertencentes a este gênero são diazotróficas, endofíticas capazes de colonizar folhas, caules e raízes principalmente de cana de açúcar

(BALDANI *et al.*, 1996). Podem atuar como fitopatógenos em algumas variedades de cana de açúcar e sorgo (BALDANI *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1997; OLIVARES, *et al.*, 1997; BALDAN *et al.*, 2005).

2.3.7 *H. seropedicae*

Foi a primeira espécie do gênero a ser descrita. Foi descoberta durante estudos com *Azospirillum* spp. A observação de células de maior robustez que as normalmente observadas para *Azospirillum* levou à descrição desse gênero (BALDANI *et al.*, 1986).

As células possuem forma vibrióide, assumindo em alguns casos forma helicoidal. Geralmente contém dois flagelos em uma ou em ambas as extremidades das células que apresentam intensa motilidade em superfícies ricas em oxigênio. As condições ótimas para crescimento ocorrem a 34 °C, e pH entre 5,3 e 8,0. São positivas para as provas de catalase, oxidase e urease. Utilizam como fonte de carbono os ácidos orgânicos malato, fumarato, piruvato, succinato e trans-aconitato e os carboidratos glucose, galactose e arabinose. São sensíveis a uma gama de antibióticos como a eritromicina, gentamicina, tetraciclina e o cloranfenicol e resistentes ao ácido nalidíxico, penicilinas, estreptomicinas, novobiocina e rifampicina. Não requerem suplementação de meio de cultura com vitaminas nem outra substância para crescimento; são incapazes de crescer em meios que contenham 2% de NaCl (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996).

Em meio JNFb semi-sólido (48 h 30-34 °C) as células formam uma película branca permanecendo vibrióides e móveis por até uma semana. São capazes de crescer em temperaturas de 38 a 41 °C quando em meio contendo fonte inorgânica de nitrogênio. Em JNFb contendo azul de bromotimol apresentam colônias pequenas, lisas, planas, esbranquiçadas com centro verde ou azul (BALDANI *et al.*, 2005).

H. seropedicae é uma bactéria endofítica (não é capaz de sobreviver bem livre no solo) que ocorre em áreas tropicais, capaz de colonizar raízes, caules e folhas de diferentes gramíneas de grande importância econômica como o milho, arroz, cana de açúcar, e o trigo (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1993;

RODRIGUES *et al.*, 2006; SILVEIRA e FREITAS, 2007). Promove a produtividade e o crescimento dos vegetais através da sua capacidade de fixar nitrogênio e da produção de fitohormônios. A maioria das estirpes é capaz de fixar nitrogênio (BALDANI *et al.*, 1995).

2.3.8 Microorganismos do gênero *Herbaspirillum* como patógenos humanos.

Os primeiros representantes do gênero a serem isolados e identificados a partir de amostras humanas tais como secreções de feridas, urina, fezes, material de trato respiratório, suco gástrico e sangue, foram denominados “*Herbaspirillum species 3*” e não eram fixadores de nitrogênio (BALDANI *et al.*, 1996).

Mais recentemente, estudos conduzidos nos Estados Unidos e na Itália, com pacientes portadores de fibrose cística, revelaram a presença de espécies de *Herbaspirillum* em amostras de trato respiratório. Duas espécies identificadas foram *H. huttiense* e *H. frisingense* (COENYE *et al.*, 2002; CAMPANA, *et al.*, 2005).

Um estudo que analisou a diversidade de bactérias presentes em aneurisma aórtico por 16S rDNA também identificou representantes do gênero *Herbaspirillum* entre outros microorganismos (SILVA *et al.*, 2006).

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* também foram associadas com celulite e bacteremia, caso descrito em um paciente após exposição de uma ferida de membro inferior à água. Foi reportado o isolamento de um bacilo gram negativo, oxidase positivo, não fermentador de lactose a partir do frasco de hemocultura incubado em aerobiose. A bactéria foi identificada como *H. seropedicae* através do sequenciamento do gene 16S rRNA (TAN e OEHLER, 2005). Outro caso relatado foi de um paciente com fibrose cística internado por problemas pulmonares, que apresentou hemocultura positiva para *Herbaspirillum spp.* Neste caso a bactéria foi inicialmente identificada como pertencente ao complexo *Burkholderia cepacia*. Contudo, o sequenciamento do 16S rRNA indicou 99,6% de similaridade com *H. putei* (SPILKER *et al.*, 2008).

O laboratório de estudos de bactérias do complexo *B. cepacia* na Universidade de Michigan identificou, entre os anos 2000 e 2007, espécies do gênero *Herbaspirillum* isoladas de 28 pacientes portadores de fibrose cística.

Inicialmente 68% (19 estirpes) desses microorganismos foram identificados, através de testes microbiológicos comerciais usuais, como pertencentes ao complexo *B. cepacia*; 14% (4 estirpes) como *Ralstonia spp*, e 18% (5 estirpes) não puderam ser identificadas ao nível de espécie. O seqüenciamento do 16S *rRNA* daquelas bactérias permitiu identificar três delas como *H. huttiense*, três como *H. frisingense*, duas como *H. seropedicae* e duas como *H. putei*; as dezoito restantes não puderam ser identificadas entre as espécies até então descritas. Essas bactérias foram subdivididas em três diferentes grupos que foram denominados como *Herbaspirillum* linhagem 1, *Herbaspirillum* linhagem 2 e *Herbaspirillum* linhagem 3 (SPILKER *et al.*, 2008).

Na República da China, foi relatado o isolamento de *Herbaspirillum* a partir de hemocultura de uma paciente com leucemia linfoblástica aguda, em tratamento com quimioterapia, que foi internada com quadro febril após a ingestão de caldo de cana. O sequenciamento do gene 16S *rRNA* permitiu identificar a bactéria como pertencente ao gênero *Herbaspirillum* (CHEN *et al.*, 2010)

Nos Estados Unidos *Herbaspirillum* spp foi relacionado a um quadro de bacteremia em uma paciente pediátrica oncológica em uso de quimioterapia. O microorganismo inicialmente foi identificado, pelo painel Gram-negativo no sistema Vitek2®, como pertencente ao complexo *B. cepacia*, porém os resultados do teste de susceptibilidade a antibióticos, não foram compatíveis com o perfil esperado para microorganismos desse grupo. Dois outros sistemas comerciais foram utilizados para a identificação: o painel de testes de identificação de gram-negativos da BD Phoenix® identificou o microorganismo como *Cupriavidus pauculus*, quando repetido o teste a identificação foi de *Ochrobactrum anthropi*. O kit Uni-N/F Tek Plate (Remel)®, para identificação de bacilos gram negativos não fermentadores, oxidase positivos não foi capaz de identificar o microorganismo. O seqüenciamento do gene 16S *rRNA* indicou identidade maior que 99,9% com *Herbaspirillum* spp (ZIGA *et al.*, 2010).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS

A necessidade de detectar e identificar microorganismos surgiu simultaneamente com os primeiros relatos de associações entre microorganismos e doenças demonstrados por pesquisadores como Koch e Pasteur (BARKEN *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

Ainda no século 19 os primeiros microbiologistas desenvolveram um sistema de classificação que dividia os grupos de bactérias de acordo com a morfologia, o tamanho e a motilidade. Com a introdução do ágar para preparo de meios de cultura, foi possível a obtenção de culturas puras, o isolamento de estirpes, e o desenvolvimento das primeiras provas de metabolismo. O progressivo desenvolvimento de diferentes testes fenotípicos permitiu que os mesmos fossem organizados em grupos de provas com a finalidade de classificar diferentes grupos de bactérias (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; JANDA e ABBOTT, 2002).

2.4.1 Identificação de microorganismos através de testes microbiológicos convencionais

Os primeiros passos para a identificação bacteriana requerem a microscopia, a análise da morfologia colonial e a caracterização fenotípica das colônias através de testes de avaliação de metabolismo (ASLANZADEH, 2006; JAMNINES e DE VOS, 2006; WEILE e KNABBE, 2009). Os sistemas de identificação podem ser classificados como convencionais, quando os testes de metabolismo são preparados no próprio laboratório, ou comerciais, testes adquiridos prontos e utilizados para identificação automatizada ou manual (ASLANZADEH, 2006).

Estão disponíveis em literatura diversos esquemas/tabelas de identificação de bactérias baseadas em sistemas convencionais que descrevem o comportamento bioquímico de diversos microorganismos, em especial aqueles reconhecidos como patógenos clássicos. Baseiam-se em uma série de provas como coloração de Gram, crescimento em aerobiose, morfologia/microscopia, crescimento em meios seletivos, testes rápidos para detecção enzimática (catalase, oxidase) e diferentes provas de

metabolismo como utilização de carboidratos e descarboxilação de aminoácidos. Geralmente inicia-se a identificação através de provas presuntivas (gram, morfologia, oxidase, outras) que permitem a divisão dos microorganismos em grupos de características semelhantes. A partir das informações iniciais o microbiologista é direcionado para esquemas mais complexos de identificação que podem levar até a determinação de gênero e espécie de muitos microorganismos de interesse clínico (ASLANZADEH, 2006).

Apesar de serem de baixo custo e amplamente difundidos, os sistemas microbiológicos clássicos são geralmente laboriosos e podem requer dias para a identificação bacteriana (MACFADDIN, 2000; ASLANZADEH, 2006).

A necessidade de padronização de provas, agilidade do processo e redução de custos impulsionou o surgimento de kits comerciais para identificação bacteriana. Estes estão baseados na miniaturização de provas convencionais com o intuito de facilitar a manipulação e reduzir o volume de reagentes e o tempo necessário para a identificação (JAMNNE e DE VOS, 2006).

Os sistemas comerciais podem variar entre manuais, semi-automatizados e automatizados. Estes sistemas permitem a inoculação simultânea de uma série de provas bioquímicas miniaturizadas, cujos resultados podem ser obtidos em curtos períodos de tempo (de duas a quatro horas) caso a detecção seja baseada na presença de enzimas e/ou produtos celulares pré sintetizados, ou em períodos mais extensos caso o sistema seja dependente do crescimento bacteriano (ASLANZADEH, 2006). Entre os sistemas comerciais mais difundidos estão: API Systems® (bioMérieux), BBL Crystal Identification System® (Becton Dickinson), BBL Phoenix Identification and Susceptibility® (Becton Dickinson), VITEK e VITEK 2 Identification System® (bioMérieux), Microscan WalkAway® (Dade MicroScan) e Biolog ID System® (Biolog) (ASLANZADEH, 2006).

Os sistemas Biolog® permitem testar simultaneamente 95 substratos, definindo um perfil característico para os microorganismos. Este perfil permite a identificação de diversos microorganismos previamente cadastrados nas bases de dados Biolog®, entre eles microorganismos fastidiosos, patogênicos e ambientais. A visualização das provas é realizada através da redução do indicador tetrazólio (incolor) em um composto roxo, indicando a oxidação/utilização do substrato disponibilizado, durante o processo de respiração da suspensão de células vivas (MILLER e RHODEN, 1991; ASLANZADEH, 2006).

2.4.2 Identificação de microorganismos através de sequenciamento de DNA.

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular trouxe notáveis avanços para a identificação de microorganismos. O uso de metodologias baseadas na detecção e/ou sequenciamento de genes tem reduzido a dependência de testes fenotípicos para a identificação de microorganismos. Enquanto os ensaios fenotípicos detectam características sujeitas a variações que podem afetar a identificação bacteriana e até levar à identificação errônea do microorganismo, os ensaios baseados na análise de DNA têm como vantagem a utilização de uma informação estável e independente da necessidade de condições para ativação ou inativação de expressão dos genes (JAMNNES e DE VOS, 2006; NOCKER *et al.* 2007; MURRAY *et al.*, 2003).

A escolha do gene, ou do conjunto de genes, a serem estudados varia de acordo com os objetivos propostos, ou seja, para estudos taxonômicos são selecionados genes ou regiões conservadas pouco suscetíveis a pressões de seleção ou transmissão horizontal, ao passo que genes que codificam características de virulência como toxinas e adesinas são utilizados para estudos relacionados com a patogenicidade do microorganismo (JAMNNES e DE VOS, 2006).

O sequenciamento de genes essenciais para a sobrevivência dos organismos, também chamados de genes “housekeeping”, é utilizado em estudos populacionais e de identificação. Esta aplicação está baseada no fato destes genes serem altamente conservados, possuírem diferentes domínios, alguns conservados e outros variáveis. As regiões conservadas entre as espécies são utilizadas como molde para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores tornando possível a amplificação da região por PCR enquanto as regiões variáveis permitem a distinção filogenética dos microorganismos (BARKEN *et al.*, 2007, NOCKER *et al.*, 2007).

O sequenciamento do gene *16S rRNA*, para a identificação de microorganismos está cada vez mais difundida entre os microbiologistas. Este gene codifica o rRNA 16S que compõe a subunidade menor do ribossomo e está presente em todas as bactérias (BARKEN *et al.*, 2007). O sequenciamento do *16S rRNA* permite a identificação de microorganismos patogênicos clássicos assim como os de comportamento fenotípico ambíguo, incomum e/ou raro (WOO *et al.*, 2008). Ele

também tem contribuído significativamente para a descrição de novos microorganismos, de microorganismos não cultiváveis, ou previamente não detectados pelas técnicas de análise disponíveis, e reduzido o tempo de identificação de microorganismos patogênicos de crescimento lento. Além disso, permitiu associar microorganismos previamente não identificados como patogênicos a casos clínicos (JANDA e ABBOTT, 2007; WOO *et al.*, 2008), ampliando o reconhecimento de oportunistas. Entretanto, em alguns casos o sequenciamento do 16S rDNA não disponibiliza informações suficientes para a distinção de alguns gêneros e/ou espécies, sendo então necessário o estudo associado de outros genes essenciais como *gyrB* e *rpoB* (JANDA e ABBOTT, 2007; WOO *et al.*, 2008).

O gene *gyrB* codifica a subunidade β da enzima DNA girase. Esta enzima pertence ao grupo de enzimas topoisomerases do tipo II que atuam na manutenção da dupla hélice da molécula de DNA durante a replicação da molécula e da segregação do cromossomo recém-replicado (HUANG, 1996). Vários estudos têm demonstrado que o gene *gyrB* é um marcador útil para estudos filogenéticos de espécies de um mesmo gênero (YAMADA *et al.*, 1999; KASAI, *et al.*, 2000; YÁÑEZ *et al.*, 2003).

Também considerado como um gene universal entre as bactérias *rpoB* codifica a subunidade beta da enzima RNA polimerase, responsável pelo processo de transcrição. O sequenciamento da região variável deste gene tem se mostrado eficaz na identificação da maior parte das bactérias analisadas (ADÉKAMBI *et al.*, 2008).

2.4.3 Identificação de microorganismos por MALDI-TOF MS

O desenvolvimento da técnica de MALD-TOF/MS ("Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry") possibilitou o uso da espectrometria de massa para a análise moléculas grandes não voláteis como peptídeos e proteínas. (LAY e HOLLAND, 2000).

O uso do MALDITOF/MS em estudos de caracterização bacteriana vem avançando nos últimos anos devido à rapidez para obtenção de resultados, o baixo custo de análise e a facilidade de execução da técnica que não requer mais que

células intactas ou extratos de célula pouco purificados como amostra para análise (BIZZINI e GREUB, 2010; LAY, 2001). Após a disponibilização de culturas puras as técnicas microbiológicas convencionais levam de 24 a 48 horas para a identificação bacteriana, enquanto o MALDITOF/MS pode fazer a identificação em poucos minutos. Além disso, o custo da identificação pode vir a ser um quarto do custo de outras metodologias convencionais (BIZZINI e GREUB, 2010).

Os resultados das análises são suscetíveis as alterações de condições experimentais, e mesmo espectros obtidos para duplicatas de uma mesma estirpe podem apresentar picos diferentes (LAY, 2001; LAY e HOLLAND, 2000). Contudo, foi observado que para bactérias geneticamente idênticas, um subconjunto de picos permanece inalterado mesmo em diferentes condições experimentais. Estes picos conservados parecem ser a razão do sucesso do uso de MALDITOF/MS para a identificação de bactérias. Os espectros têm sido amplamente estudados, a fim de estabelecer padrões para diferentes espécies e assim possibilitar a identificação bacteriana (LAY, 2001).

O MALDITOF/MS vem sendo apontado como um potencial substituto para as metodologias atualmente utilizadas na rotina laboratorial (BIZZINI *et al.*, 2010; BIZZINI e GREUB, 2010; TONOLLA *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estirpes de *Herbaspirillum* spp isoladas de humanos e do ambiente através da utilização de análises fenotípicas e moleculares.

3.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as estirpes de *Herbaspirillum* frente a um painel de provas microbiológicas convencionais;
- Verificar as reações apresentadas pelas estirpes utilizando um painel comercial de provas bioquímicas;
- Testar os isolados clínicos de *Herbaspirillum* quanto à capacidade de fixar nitrogênio;
- Determinar a sequência de bases do gene *gyrB* das estirpes isoladas de humanos;
- Caracterizar as estirpes de *Herbaspirillum* utilizando MALDI-TOF/MS;
- Determinar a capacidade das estirpes de *Herbaspirillum* em aderir em linhagem celular derivada de humanos;
- Verificar se as estirpes apresentam atividade hemolítica;
- Verificar a presença de atividade citotóxica entre as estirpes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Para o desenvolvimento desta dissertação foram utilizadas sete estirpes de *Herbaspirillum* spp. isoladas de infecções em humanos, gentilmente cedidas pelo Dr. John LiPuma da Universidade de Michigan, e oito estirpes isoladas do ambiente, parte da bacterioteca do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR.

TABELA 1 - ESTIRPES DE *Herbaspirillum* spp.

Espécie	Estirpe	Fonte
<i>H. frisingense</i>	AV 14559	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>H. huttiense</i>	AV 11883	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>H. putei</i>	AV 13384	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>H. seropedicae</i>	AV 14040	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>Herbaspirillum linhagem 1</i>	AV 14775	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>Herbaspirillum linhagem 2</i>	AV 13965	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>Herbaspirillum linhagem 3</i>	AV 3926	SPILKER <i>et al.</i> , 2008
<i>H. frisingense</i>	GSF-30	KIRCHOFF <i>et al.</i> , 2001
<i>H. hiltneri</i>		ANTON HARTMANN
<i>H. huttiense</i>	IAM 14941	LEIFSON, 1962; DING e YOKOTA, 2004
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	VALVERDE <i>et al.</i> , 2003
<i>H. putei</i>	IAM 15032	DING e YOKOTA, 2004
<i>H. rubrisulbalbicans</i>	M4	CHRISTOPHER e EDGERTON, 1930; BALDANI <i>et al.</i> , 1996
<i>H. seropedicae</i>	Z67	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
<i>H. seropedicae</i>	Smr1	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997

FONTE: O AUTOR, 2011

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESTOCAGEM DE BACTÉRIAS

As estirpes de *Herbaspirillum* spp foram cultivadas em meio ágar Triptona de Soja (TSA-Merck®) e ágar Cistina Lactose Eletrólitos Deficiente (CLED-Merck®). Os cultivos de estirpes isoladas de humanos foram incubados a 36 ± 1 °C sob

aerobiose, e os de isolados do ambiente a 30 ± 1 °C. As bactérias foram estocadas em Skim Milk (CHAPIN e LAUDERDALE, 2003) à -20 °C e em NFbHP malato semi-sólido (KLASSEN et al., 1997) à temperatura ambiente.

4.3. TESTES FENOTÍPICOS

4.3.1 Testes microbiológicos convencionais

A morfologia e reação tintorial das bactérias foram determinadas através da coloração de Gram.

A determinação da temperatura ótima de crescimento foi feita em ágar triptona glucose extrato de levedura (TGY) incubado por 24 a 48 horas nas temperaturas de 25 °C, 30 °C, 36 °C e 42 °C (WEYANT *et al.*, 1996).

Para a caracterização das estirpes foram utilizados os testes recomendados nos algoritmos para a identificação de bactérias gram negativas aeróbias (SCHRECKENBERGER *et al.*, 2003; SCHRECKENBERGER e WONG, 2003), utilizando a temperatura de crescimento de 36 ± 1 °C para os isolados humanos, e 30 ± 1 °C para os isolados do ambiente. As bactérias foram testadas quanto as seguintes características: citocromo oxidase, catalase, hidrólise de gelatina, motilidade, ONPG, uréia de Christensen, redução de nitrato, indol, esculina, utilização de citrato; crescimento em ágar MacConkey, ágar SS, ágar cetrimide; fermentação da D-glucose; oxidação da D-glucose, sacarose, lactose, glicerol, trealose, arabinose, maltose, ramnose, manitol, xilose e frutose; descarboxilação da lisina e ornitina, arginina dihidrolase, e desaminação da fenilalanina. A capacidade de crescer na ausência de NaCl e em concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6% de NaCl foi determinada em culturas realizadas em caldo nutriente. Foram também verificados o padrão de hemólise em ágar sangue de carneiro e resistência à polimixina B (300U) em ágar TSA e ágar sangue de carneiro. Os testes bioquímicos convencionais foram preparados e interpretados de acordo com MacFaddin (2000). Esses ensaios foram realizados em duplicata e os resultados interpretados por três pessoas.

4.3.2 Teste fenotípico – BIOLOG®

Inicialmente as culturas foram crescidas em meio TSA-Merck®, por 24 – 48 horas a 36 °C (para os isolados clínicos) ou a 30 °C (para os ambientais) para a obtenção de colônias isoladas. Estas foram utilizadas para inocular 10 mL de TSB-Merck® que foi incubado por 24 horas nas temperaturas citadas acima, sob agitação de 160 rpm. Uma alíquota de 3,0 ml da cultura foi centrifugada a 2000 rpm por dois minutos, e o sedimento utilizado para preparar uma suspensão bacteriana em solução inoculante Biolog®, com transmitância de 58% em 590 nm. A seguir alíquotas de 150 µL da suspensão de bactérias foram inoculadas em cada um dos 96 poços (95 substratos e um controle) da placa Biolog® GN2 que foi incubada nas temperaturas citadas acima. As leituras foram realizadas visualmente após 24 e 48 horas da inoculação. Foram considerados positivos os testes nos quais houve o aparecimento de coloração púrpura. As provas foram realizadas em triplicata.

4.3.3 Ensaio da Nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método da redução do acetileno a etileno (DILK WORTH, 1966). As culturas foram realizadas em meio semi-sólido NFbHP malato contendo 0,5 mM de glutamato, incubado nas temperaturas de 30 °C e 36 °C. A estirpe de *H. seropedicae* Smr1 foi utilizada como controle positivo.

Após a formação de uma película visível na superfície do meio inoculado com o controle positivo (*H. seropedicae* estirpe Smr1), os frascos foram fechados com rolhas de borracha (tipo “sub Seal”) e etileno foi injetado no frasco lacrado (10% da fase gasosa). As culturas foram incubadas por uma hora a 30 °C e a produção de etileno determinada pela injeção de 0,5 ml da fase gasosa em cromatógrafo a gás. Este ensaio foi realizado nos laboratórios do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.4.1 Sequenciamento de DNA

4.4.1.1 Extração de DNA

O DNA foi purificado utilizando a metodologia de extração com fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As culturas foram incubadas em meio TSB a 36 °C e 120 rpm, por 18 horas. Em seguida 3 mL da cultura foi centrifugado a 14.000 rpm por dois minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células no sedimento lavadas com 1 mL de tampão T₅₀ E₂₀ NaCl₂₀₀ e novamente centrifugadas a 14.000 rpm. O sobrenadante novamente foi descartado e as células precipitadas resuspensas em 450 µl de T₅₀ E₂₀ NaCl₂₀₀.

Lisozima foi adicionada à suspensão de células até a concentração de 100 µl/mL, seguida de incubação por um período de cinco a dez minutos a temperatura ambiente. Após este período, 50 µL de SDS 10% foram adicionados ao sistema, e a mistura foi então incubada a 50 °C por cinco a dez minutos, até ocorrer lise celular. Então Proteinase K foi adicionada à mistura na concentração de 50 µg/mL, o que foi seguido de incubação por 4 horas a 37 °C.

Após este período, o DNA foi extraído com 100 µL de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), através de homogeneização por inversão seguida de centrifugação por 15 minutos à 14000 rpm. A fase aquosa contendo o DNA foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA foi então lavado com 1 mL de etanol 80%, seco e resuspenso em 50 µL de água ultra-pura estéril.

4.4.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação do gene *gyrB* foi realizada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *gyrB1F* 5' – GACAACGGCCGCGGSATTCC – 3' e *gyrB2R* 5' - CACGCCGTTGTTCAGGAASG – 3' descritos por TAYEB e colaboradores (2008). As reações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão da Taq DNA polimerase 1x (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40, Fermentas), MgCl₂ 1,5 mM, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Bioneer), dNTP 0,2 mM (Invitrogen) e aproximadamente 20 nmol de DNA genômico como molde. As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: 1 ciclo de 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, seguidos de 1 ciclo de 72 °C por cinco minutos.

4.4.1.3 Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0) (SAMBROOK *et al.*, 1989). A corrida eletroforética foi realizada a 35 V por aproximadamente duas horas. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) durante 15 minutos, observado sob luz UV (302 nm) e fotodocumentado utilizando o sistema UVP Imaging System.

4.4.1.4 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram tratados com as enzimas Exonuclease I (3,3 U - USB) e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – USB, 0,66 U - GE Healthcare) a fim de eliminar os oligonucleotídeos iniciadores e dNTPs presentes na mistura de reação.

Os tubos contendo as misturas foram incubados a 37 °C por 45 minutos, seguidos de 15 minutos a 80 °C. Os produtos purificados foram então utilizados para a reação de sequenciamento.

4.4.1.5 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o método de término de cadeia de Sanger modificado (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977), empregando dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos.

As reações foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 200 ng do produto de PCR tratados e 4 µL do reagente *DYEnamic ET Sequence Premix Terminator* (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Amersham Biosciences). O seguinte programa foi utilizado: 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 60 °C por 30 s. O produto da reação de sequenciamento foi transferido para tubo plástico de 500 µL ao qual foram adicionados 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 60 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex, mantida a temperatura ambiente por 20 minutos e então centrifugada por 25 min a 14000 rpm em microcentrífuga Eppendorf modelo 5410. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 250 µL de etanol 70% e seco em estufa a 37 °C.

O produto obtido foi dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems) e submetido à eletroforese no Seqüenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377 do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As seqüências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), BLASTN (ALTSCHUL 1997) e CLUSTAL W (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/>).

4.4.2 Espectrometria de massa MALDI-TOF

4.4.2.1 Preparo da Amostra

Colônias isoladas das bactérias crescidas em ágar TSA, foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL, lavadas com 1 mL de água, centrifugadas a 14000 rpm (centrifuga Eppendorf modelo 5410) por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido mais uma vez. A seguir, o sedimento foi suspenso em 1 mL de etanol 75% (v/v), e após 10 minutos centrifugado nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi descartado, o sedimento seco em estufa a 37 °C, e então acrescido de 50 µL de ácido fórmico 70% e 50 µL de acetonitrila. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos e 1µL do sobrenadante depositado sobre uma placa para análise no espectrômetro de massa e seco ao ar em temperatura ambiente. Então, 1 µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/ml) dissolvida em acetonitrila: ácido trifluoroacético 2,5% (1:1) foi adicionado às amostras e seco ao ar (SAUER *et.al.*, 2008). As amostras foram encaminhadas para análise nos laboratórios do grupo de Fixação de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

4.4.2.2 Análise das amostras

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massa Autoflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) equipado com laser de nitrogênio (337nm). Os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo usando uma aceleração de 20 kV. A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual, com auxílio do programa Autoexecute FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics), utilizando resolução entre 600 e 1500 arb, uma média de mil tiros de laser (100 disparos de laser em 10 posições diferentes da amostra) e aquisição de sinais com valores m/z entre 3.000 a 20.000. A matriz utilizada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Como calibrador foi utilizado uma mistura de insulina (M+H) (5734,52000 m/z), ubiquitina I (M+H) (8565,7600 m/z), citocromo C (M+2H) (6181, 05000 m/z), citocromo (M+H) (12360,97000 m/z), mioglobina (M+2H) (8476,6600 m/z) e mioglobina (M+H) (16952,31000 m/z) (Protein Calibration Standart I- Bruker Daltonics).

Cada amostra foi aplicada em cinco pontos diferentes da placa de MALDI e a aquisição dos espectros realizada como descrito acima.

4.4.2.3 Análise dos espectros

Os dados gerados foram submetidos à análise de picos em comuns através do programa Speclust disponível no site: <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> (ALM *et al.*, 2006) a fim de gerar um espectro médio para cada amostra, a variação tolerada foi de ± 5 m/z. Os espectros médios obtidos foram então processados, utilizando como critério para o estabelecimento de picos comuns aqueles presentes em pelo menos três das cinco replicatas (sendo o índice de incidência do pico maior ou igual a 0,6) (FRANCO *et al.*, 2010).

Os espectros médios foram analisados utilizando o software Speclust (ALM *et al.*, 2006), a fim de agrupar as listas de picos das diferentes estirpes e gerar um dendrograma.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”

4.5.1 Ensaio de adesão celular utilizando células HeLa

A capacidade das estirpes de *Herbaspirillum* aderirem sobre células humanas foi determinada utilizando-se monocamadas da linhagem celular HeLa (ATCC cód.CCL-2) conforme metodologia descrita por SCALETISKY e colaboradores (1984, 1999).

As células HeLa foram cultivadas em frascos de cultura com faces planas contendo meio de cultivo celular DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas sob atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C. Após a remoção do tapete celular com tripsina e contagem em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas (2×10^4 por poço) em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. As microplacas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

As quinze estirpes de *Herbaspirillum* foram cultivadas por aproximadamente 18 horas em caldo TSB sob agitação de 160 rpm a 37°C (isolados humanos) ou a 30°C (isolados ambientais). Essas culturas foram utilizadas na preparação de inóculos com turvação padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Cem microlitros dos inóculos foram adicionados nos poços contendo as culturas de células HeLa, e então foram acrescentados 400 µL de DMEM estéril sem antibióticos e sem soro fetal bovino. Após três e seis horas de incubação a 37° C, as culturas foram lavadas cinco vezes com PBS estéril, fixadas com 2% de formol por dois minutos e submetidas à coloração de MayGrünwald-Giemsa. Então as lamínulas foram lavadas em água corrente, secas e analisadas em microscópio óptico Zeiss Axiophot com sistema de captura de imagem acoplado.

Como controle negativo do experimento bactérias não foram adicionadas a alguns poços, sendo as culturas de células HeLa incubadas apenas com 400 µL de DMEM e 100 µL de solução salina estéril. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5.2 Determinação do potencial citotóxico das estirpes de *Herbaspirillum* sobre a linhagem celular Vero

Para avaliar um possível efeito citotóxico de *Herbaspirillum* sobre células Vero foi utilizado o método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil Tetrazólio) - MTT. O princípio deste método, descrito por Mosman (1983), consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células. Quando as células estão viáveis as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o MTT levando a sua redução e formando cristais púrpuras de formazan. Portanto, quanto maior o número

de células viáveis, mais cristais de formazan são formados. Esses cristais são solubilizados com isopropanol em meio ácido e a cor formada é quantificada através de espectrofotometria em 550 nm.

Para a realização do ensaio foram plaqueadas 5.000 células da linhagem celular Vero em microplacas de 96 poços. Às células foram então adicionados 20 µL de uma suspensão de *Herbaspirillum* sp preparada em salina a partir da centrifugação (5.000 rpm por quatro minutos) de 3 ml de cultura em TSB e ajuste de turvação para 2 da escala de MacFarland. Foram então adicionados 80 µL do meio de cultivo celular – DMEN, e as células foram incubadas por 6, 18 e 24 horas em estufa a 37 °C contendo 5% CO₂. Após estes períodos foram adicionados aos poços 45 µL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL. A placa foi novamente incubada a 37 °C e após 2 horas foram adicionados 100 µL de isopropanol / ácido HCl 0,01 M. Como controle foram utilizados poços contendo as células Vero incubadas com 20 µL de TSB estéril e 80 µL de DMEN. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

As células da linhagem Vero foram também avaliadas quanto a sua morfologia em microscópio invertido após 6, 12 e 24 horas de incubação com *Herbaspirillum* sp.

4.5.3 Determinação da produção de hemolisina

A capacidade de diferentes estirpes de *Hesbaspirillum* sp provocar a lise de eritrócitos humanos foi verificada através do método de SCHEFFER e colaboradores (1988) com algumas modificações. Resumidamente estirpes de *Herbaspirillum* sp foram inoculadas em caldo TSB e incubadas sob agitação de 150 rpm a 37 °C. Após 6, 18 e 24 horas, porções de 0,2 mL da cultura foram coletadas e incubadas em tubos de 1,5 mL por duas horas a 37°C com 0,2 mL de uma suspensão contendo 10⁸/mL eritrócitos humanos do grupo “O” Rh positivo em tampão CaCl₂ 20 mM, Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Após a incubação os microtubos foram centrifugados a 2000 rpm por três minutos e a absorbância da hemoglobina liberada no sobrenadante foi determinada em 550 nm. Os níveis de hemólise foram representados em porcentagem em relação ao controle positivo (hemólise de 100%, obtida através da adição de 0,2 mL de TSB e Triton X-100 0,1% a uma suspensão

de eritrócitos). O controle negativo foi a suspensão de eritrócitos humanos com TSB incubada pelos mesmos períodos utilizados para os testes com *Herbaspirillum* sp. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.5.4 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e produção de hemólise foi utilizado análise de variância (ANOVA de uma via) e pós teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. Para tais análises foi utilizado o software *Graphpad* versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

5.1.1 Testes microbiológicos convencionais

Todas as estirpes de *Herbaspirillum* sp se desenvolveram bem nos meios TGY (WEYANT et al., 1996), CLED e TSA (Difco), sendo o último o escolhido para o cultivo das bactérias. Os resultados dos testes microbiológicos convencionais (SCHRECKENBERGER *et al.*, 2003; SCHRECKENBERGER e WONG, 2003) estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONAIS. Continua

Provas	H. Linhagem 3 (AV 3926)	H. Linhagem 2 (AV 13965)	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. seropedicae Z 67	H. seropedicae Smr1	H. seropedicae (AV 14040)	H. frisingense (GSF 30)	H. frisingense (AV 14559)	H. rubrisubalbica ns (M4)	H. hiltneri (HILT)	H. lusitanum (P6-12)
Gram	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN	BGN
Oxidase	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Catalase	N	F	N	N	F	F	N	F	N	F	N	F	N	P	P
TGY 25°C (24h)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
TGY 30°C (24h)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
TGY 36°C (24h)	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
TGY 42°C (24-48h)	P	P	F	N	F	N	F	N	P	P	N	F	P	N	N
TSI	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc
H ₂ S (TSI)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Citrato	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Uréia	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Nitrato	P	P	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N
Nitrato-gás	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Indol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Esculina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Motilidade	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
ONPG	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N
Fenilalanina desaminase	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Arginina dihidrolase	N	N	N	P	N	P	N	P	N	N	P	N	N	N	P
Ornitina descarboxilase	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lisina descarboxilase	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MacConkey	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Agar SS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cetrimide	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Gelatina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Caldo Nutriente s/ NaCl	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Caldo Nutriente 1% NaCl	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Caldo Nutriente 2% NaCl	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Caldo Nutriente 3% NaCl	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N
Caldo Nutriente 4% NaCl	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Caldo Nutriente 5% NaCl	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Caldo Nutriente 6% NaCl	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

LEGENDA: Alc/Alc =crescimento e ausência de ácido na base e ápice do TSI; F=fracamente positivo, N=negativo, P=positivo

TABELA 2 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* NOS TESTES MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONAIS. Conclusão.

Provas	H. Linhagem 3 (AV 3926)	H. Linhagem 2 (AV 13965)	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. seropedicae Z 67	H. seropedicae Smr1	H. seropedicae (AV 14040)	H. frisingense (GSF 30)	H. frisingense (AV 14559)	H. rubrisubalbica ns (M4)	H. hiltneri (HILT)	H. lusitanum (P6-12)
Fermentação D-Glucose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido de D-Glucose	P	P	P	P	P	F	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido de Sacarose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido de Lactose	N	N	P	ND	ND	N	ND	N	N	N	F	ND	N	N	N
Ácido de Glicerol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido de Trealose	N	N	N	N	F	N	N	N	N	ND	N	N	N	N	N
Ácido de Arabinose	P	F	P	F	P	F	F	F	F	F	P	P	P	P	P
Ácido de Maltose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido de Ramnose	N	F	N	N	N	N	N	F	N	P	N	N	N	N	P
Ácido de Manitol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido de Xilose	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido de Frutose	P	F	P	ND	F	F	F	F	F	F	P	F	P	F	P

LEGENDA: F=fracamente positivo, N=negativo, P=positivo, ND= não determinado

FONTE: O AUTOR, 2011

Os resultados obtidos confirmam a morfologia e reação tintorial esperada para bactérias do gênero *Herbaspirillum*. Indicam também que essas bactérias pertencem ao grupo dos bacilos gram negativos não fermentadores (BGN-NF), que compreende bactérias aeróbias que crescem no ápice do ágar TSI, mas não são capazes de acidificar o meio.

Todas as estirpes apresentaram as características comuns ao gênero descritas na literatura: reações positivas para a oxidase, uréia e metabolismo oxidativo para alguns carboidratos.

Todas as estirpes cresceram em ágar sangue de carneiro e não apresentaram hemólise. A suscetibilidade à polimixina B (300U) foi analisada pelo crescimento em ágar TSA e em ágar sangue. A maioria das estirpes não apresentou halo de inibição, crescendo até a borda do disco, o que indica resistência a este antimicrobiano. Halos de inibição foram observados para as seguintes estirpes: *H. frisingense* GSF-30 (10 mm em ágar sangue e 8 mm TSA); *H. huttiense* IAM 14941 (11,5 mm em ágar sangue e 10,5 mm em TSA); *H. seropedicae* Z67 (11 mm em ágar sangue e 12 mm em TSA); *H. lusitanum* P6-12 (11 mm em ágar sangue e 12 mm em TSA). Como controle foi utilizada a estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, suscetível a polimixina, que apresentou halo de 13,5 mm em ágar sangue e 12,5 mm em TSA.

Considerando apenas os testes com reações variáveis entre as estirpes, e para os quais não foram observadas reações fracamente positivas, ou seja: redução do nitrato a nitrito, arginina, ONPG e crescimento em caldo nutriente contendo 3% de NaCl, respectivamente, foi possível classificar as estirpes em 8 grupos:

- grupo 1: reações positivas para redução do nitrato a nitrito, ONPG e negativas para as demais. Inclui a Linhagem 3, as estirpes de *H. seropedicae* Smr1 e AV 14040, *H. frisingense* AV 14559 e *H. rubrisubalbicans*.
- grupo 2: reações positivas para redução do nitrato a nitrito, ONPG, crescimento em caldo nutriente com 3% de NaCl e negativa para arginina dihidrolase; contém apenas a Linhagem 2.
- grupo 3: reações positivas apenas para ONPG. Inclui a Linhagem 1, *H. huttiense* AV 11883 e *H. putei* AV 13384, ambos isolados humanos.
- grupo 4: reação positiva apenas para ONPG e arginina. Contém os isolados ambientais *H. huttiense* IAM 14941 e *H. putei* IAM 15032.

- grupo 5: reações positivas para redução do nitrato a nitrito, ONPG e arginina dihidrolase; contém apenas a estirpe Z67 de *H. seropedicae*.
- grupo 6: reações positivas para redução do nitrato a nitrito, ONPG, arginina e crescimento em caldo nutriente contendo 3% de NaCl; contém apenas a estirpe GSF-30 de *H. frisingense*.
- grupo 7: negativo para todas as provas acima, contém a espécie *H. hiltineri*.
- grupo 8: positivo apenas para a arginina dihidrolase, contém a espécie *H. lusitanum*.

5.1.2 Teste microbiológico comercial Biolog®

Frente à necessidade de um maior número de provas bioquímicas para a diferenciação das estirpes foi utilizado um sistema comercial (Biolog®), que contém 95 substratos, para a melhor caracterização dessas bactérias. Foram utilizadas as microplacas “GN2 Gram negative identification test panel” Biolog® para a análise de todas as estirpes isoladas de humanos e as ambientais *H. seropedicae* Smr1, *H. huttiense* e *H. putei*. Os resultados encontram-se descritos na tabela abaixo (Tabela 3).

TABELA 3 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* NO PAINEL Biolog® GN2. Continua

Provas	H. Linhagem 3 (AV 3926)	H. Linhagem 2 (AV 13965)	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. seropedicae (Smr1)	H. seropedicae (AV 14040)	H. frisingense (AV 14559)
α-ciclodextrina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Dextrina	F	F	F	N	F	N	F	N	F	F
Glicogênio	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tween 40	F	F	F	F	F	N	F	N	F	F
Tween 80	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
N-acetil-D-galactosamina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
N-acetil-D-glucosamina	P	F	P	F	P	F	P	P	P	F
Adonitol	P	P	P	F	P	P	P	P	P	N

LEGENDA: F=fracamente positivo, N=negativo, P=positivo.

TABELA 3 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* NO PAINEL Biolog® GN2. Continua

Provas	H. Linhagem 3 (AV 3926)	H. Linhagem 2 (AV 13965)	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. seropedicae (Smr1)	H. seropedicae (AV 14040)	H. frisingense (AV 14559)
L-Arabinose	P	P	P	F	P	P	P	P	P	P
D-Arabitól	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D-Celobiose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
i-Eritritol	P	P	N	P	P	P	P	N	N	N
D-Fructose	P	F	P	F	P	P	P	P	P	F
L-Fucose	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D-Galactose	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Gentiobiose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-Glucose	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
m-Inositol	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N
D-Lactose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lactulose	N	N	P	F	P	N	P	N	N	N
Maltose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-Manitol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D-Manose	P	P	P	F	P	P	P	P	P	P
D-Melibiose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
B-Metil-D-Glucoside	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-Psicose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-Rafinose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
L-Ramnose	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N
D-sorbitol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Sacarose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-Trealose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Turanose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Xilitol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Metil piruvato	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Mono Metil Succinato	P	P	F	F	P	F	F	P	P	P
Ácido acético	P	P	F	F	P	F	P	P	P	P
Ácido cis-aconítico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido cítrico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido fórmico	P	P	P	F	P	F	P	P	P	P
Ácido D-galactônico lactona P	F	F	F	F	F	N	F	F	F	F
Ácido D-galacturônico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido D-glucônico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido D-glucosaminico	F	F	F	N	P	N	P	F	P	F
Ácido D-glucurônico	P	P	P	P	P	F	F	P	P	F
Ácido α-hidroxibutírico	F	F	F	F	F	N	F	F	F	F
Ácido β-hidroxibutírico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido γ-hidroxibutírico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido p-hidroxi- fenilacético	P	P	P	P	P	P	P	F	P	P
Ácido itaconico	P	P	F	N	P	F	P	F	P	P
Ácido α-cetobutírico	P	P	P	F	P	F	F	F	P	F
Ácido α-cetoglutárico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

LEGENDA: F=fracamente positivo, N=negativo, P=positivo.

TABELA 3 - REAÇÕES OBSERVADAS PARA AS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* NO PAINEL Biolog® GN2. Conclusão

Provas	H. Linhagem 3 (AV 3926)	H. Linhagem 2 (AV 13965)	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. seropedicae (Smr1)	H. seropedicae (AV 14040)	H. frisingense (AV 14559)
Ácido α-cetovalérico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido α-D,L,lático	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido malônico	F	F	F	F	F	N	F	F	F	F
Ácido propiônico	P	P	P	F	P	F	F	P	P	P
Ácido quínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
Ácido D-sacarico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido sebácico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido succínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido bromosuccínico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido succinâmico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Glucuronamida	P	P	F	F	P	F	F	P	P	N
L-alaninamida	F	N	F	F	F	N	F	F	P	N
D-alanina	F	P	F	F	P	N	P	F	P	P
L-alanina	P	F	F	F	F	N	P	F	F	P
L-alanil-glicina	F	N	F	F	F	N	P	N	F	N
L-asparagina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido L-aspartico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido L-glutâmico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido glicil-L-aspartico	N	N	N	N	F	N	N	N	N	N
Ácido glicil-L-glutâmico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
L-histidina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Hidroxi-L-prolina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
L-leucina	F	F	F	F	F	N	P	F	F	F
L-ornitina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
L-fenilalanina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
L-prolina	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Ácido L-pirolutâmico	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D-serina	F	F	N	N	F	N	N	N	F	F
L-serina	F	N	F	N	F	N	F	F	F	N
L-treonina	F	F	F	F	F	N	P	F	F	N
D,L-carnitina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido γ-aminobutírico	P	P	P	P	P	F	P	P	P	P
Ácido urocanico	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Inosina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Uridina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Timidina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Feniletil-amina	N	N	N	N	N	N	N	F	N	N
Putrescina	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2-Aminoetanol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2,3-Butanediol	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Glicerol	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D,L-α-glicerol fosfato	F	P	F	F	F	F	F	P	P	F
A-D-glucose-1-fosfato	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-glucose-6-fosfato	P	F	F	N	N	N	N	P	P	N

LEGENDA: F=fracamente positivo, N=negativo, P=positivo.

FONTE: O AUTOR, 2011

As microplacas Biolog contém 96 poços um dos quais é o branco e os outros 95 contém uma fonte de carbono diferente e um corante indicador redox, violeta de tetrazólio. Durante o processo de respiração celular ocorre a redução do tetrazólio a formazan resultando em uma coloração violeta que indica um teste positivo. Este sistema comercial para identificação bacteriana contém vários ensaios não contemplados nas análises microbiológicas realizadas na rotina dos laboratórios clínicos.

Entre as 10 estirpes analisadas todas apresentaram resultados similares em 70 testes, sendo 30 negativos e 40 positivos (Tabela 3). As reações variáveis entre as estirpes ocorreram para as fontes de carbono dextrina, tween 40, adonitol, eritritol, m-inositol, lactulose, ramnose, ácido D-galactônico lactona P, ácido D-glucosaminico, Ácido α -hidroxibutírico, Ácido itaconico, Ácido malônico, Ácido quínico, Glucuronamida, L-alaninamida, D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, Ácido glicil-L-aspartico, D-serina, L-serina, L-treonina, Feniletil-amina, e glucose-6-fosfato. Excluindo-se os testes variáveis que apresentaram resultados fracamente positivos entre as estirpes, as reações apresentadas frente aos substratos eritritol, m-inositol, ramnose e Ácido quínico podem ser utilizados para agrupar as dez estirpes em 6 classes:

- 1: positivo para todas as provas citadas acima, contém a Linhagem 2.
- 2: negativo para todas as provas acima, contém a estirpe *H. frisingense* AV 14559.
- 3: positivo para todas as provas, exceto o eritritol. Contém as estirpes de *H. seropedicae* Smr1 e AV 14040.
- 4: positivo para o eritritol e ácido quínico: As estirpes de *H. huttiense* IAM 14941 e AV 11883 e as estirpes de *H. putei* IAM 15032 e AV 13384.
- 5: positivo apenas para o ácido quínico: A Linhagem 1
- 6: negativo apenas para ramnose: Padrão observado para a Linhagem 3.

5.1.3. Ensaio da Nitrogenase

Apenas as sete estirpes isoladas de amostras clínicas foram analisadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio, uma vez que as estirpes de

origem ambiental foram previamente estudadas (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996; KIRCHHOF *et al.*, 2001; VALVERDE *et al.*, 2003).

A estirpe ambiental Smr1 foi utilizada como controle positivo, e demonstrou capacidade de reduzir o acetileno à etileno (12,0 m.mol de etileno min⁻¹ mg de proteína⁻¹, SD= 0,74 de três ensaios). Entretanto não foi observada atividade de nitrogenase em nenhuma das estirpes isoladas de amostras clínicas nas condições de ensaio utilizadas sugerindo que não são capazes de fixar nitrogênio.

5.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.2.1 Sequenciamento do gene *gyrB* de isolados humanos de *Herbaspirillum*

Os resultados do sequenciamento parcial dos genes *gyrB* dos isolados humanos de *Herbaspirillum* sp estão mostrados na tabela 4 e figura 1.

TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DISPONÍVEIS NO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM AS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE *Herbaspirillum* spp. Continua.

Estirpe	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
<i>Herbaspirillum</i> linhagem 3 (AV3926)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	525	4e-127	94%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene <i>gyrB</i> para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	462	4e-127	94%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (<i>gyrB</i>), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	423	4e-115	93%

TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DISPONÍVEIS NO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM AS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE *Herbaspirillum* spp. Continua.

Estirpe	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
<i>H. huttiense</i> (AV11883)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	518	6e-125	94%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene gyrB para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	455	6e-125	94%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (gyrB), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	423	4e-115	93%
<i>H. putei</i> (AV13384)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	525	4e-127	94%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene gyrB para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	462	4e-127	94%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (gyrB), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	399	4e-108	91%
<i>Herbaspirillum linhagem 2</i> (AV13965)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	606	2e-150	100%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene gyrB para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	540	2e-150	100%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (gyrB), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	376	5e-101	89%

TABELA 4 - SEQUÊNCIAS DISPONÍVEIS NO GENBANK QUE PRODUZIRAM ALINHAMENTOS SIGNIFICATIVOS COM AS SEQUÊNCIAS DOS AMPLICONS DE *Herbaspirillum* spp. Conclusão.

Estirpe	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
<i>H. seropedicae</i> (AV14040)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	601	8e-149	99%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene gyrB para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	535	8e-149	99%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (gyrB), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	372	6e-100	89%
<i>H. fringsingense</i> (AV14559)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	559	5e-126	96%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene gyrB para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	459	5e-126	93%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (gyrB), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	369	7e-99	88%
<i>Herbaspirillum</i> linhagem 1 (AV14775)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1, genoma completo-gene: subunidade B DNA girase (número de acesso CP002039.1).	564	2e-124	93%
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene gyrB para subunidade β DNA girase, topoisomerase tipo II, atividade ATPase, proteína (número de acesso AM490563.1).	453	2e-124	93%
	<i>Herbaspirillum huttiense</i> estirpe CIP 103296. Subunidade β do gene da DNA girase (gyrB), parcial cds (número de acesso EU024189.1).	387	3e-104	90%

FONTE: O AUTOR, 2011

```

14040      TCGTCATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
13965      TCGTCATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
Smr1       TCGTCATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
14559      TCGTGATGACCGAGCTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
3926      TCGTGATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
11883      TCGTGATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
13384      TCGTGATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
14775      TCGTGATGACCGAACTGCACGCCGGCGGCAAGTTCGACCAGAACTCCTACAAGGTCTCCG 60
          ****

14040      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAACGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
13965      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAACGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
Smr1       GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAACGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
14559      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAACGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
3926      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAATGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
11883      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAATGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
13384      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAATGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
14775      GCGGCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCGTGAATGCACTGTGGAAGAACTGAAGCTCA 120
          *****

14040      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
13965      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
Smr1       CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
14559      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
3926      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
11883      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
13384      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
14775      CCATCCGCCGCGACGGCAAGGTGCACGCCATGGAATTTGCCAAGGGCATCGTGCAGAATC 180
          *****

14040      GCGAACTGGAGATGGTTCGACGGCGTGCAGGTCTCGCCCATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
13965      GCGAACTGGAGATGGTTCGACGGCGTGCAGGTCTCGCCCATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
Smr1       GCGAACTGGAGATGGTTCGACGGCGTGCAGGTCTCGCCCATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
14559      GCGAACTGGAAATGATCGATGGCGTGCAGGTCTCGCCCATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
3926      GCGAGCTGGAGATGGTGGATGGCGTGCAGGTCTCCCCGATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
11883      GCGAGCTGGAGATGGTGGATGGCGTGCAGGTCTCCCCGATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
13384      GCGAACTGGAGATGGTGGATGGCGTGCAGGTCTCGCCCATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 239
14775      GCGAACTGGAGATGATCGATGGCGTGCAGGTCTCCCCGATCAAGGTCATCGGCGAATCCG 240
          *****

14040      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAGATCTTCAACCCACGTCGAA 299
13965      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAGATCTTCAACCCACGTCGAA 299
Smr1       ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAGATCTTCAACCCACGTCGAA 299
14559      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGATGAAGAAATCTTCAACCCACGTCGAA 299
3926      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAAATCTTCAACCCACGTCGAA 299
11883      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAAATCTTCAACCCACGTCGAA 299
13384      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAAATCTTCAACCCACGTCGAA 299
14775      ACAAGCGCGGCACCGAAGTGCACCTTCTGGGCCGACGAAGAAATCTTCAACCCACGTCGAA 299
          *****

```

FIGURA 1: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DOS AMPLICONS DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* ISOLADAS DE HUMANOS COM A SEQUÊNCIA CORRESPONDENTE DA ESTIRPE DE *H. seropedicae* Smr1 DISPONÍVEL NO GENBANK (NÚMERO DE ACESSO CP002039.1). Os asteriscos indicam posições com nucleotídeos idênticos.

FONTE: O AUTOR, 2011

Os genes *gyrB* dos isolados clínicos de *Herbaspirillum* sp foram parcialmente seqüenciados, em ambos os sentidos, produzindo um fragmento de 299 pb. A tabela 4 indica três resultados da análise com o programa BLAST para os quais foram observados maiores valores de identidade. Para as sequências de todas as estirpes a maior identidade foi observada com a

subunidade B da DNA girase de *H. seropedicae* Smr1 (genoma completo), com valores variando de 93% a 100%. O alinhamento dessas sequências está representado na figura 1.

Alinhamentos significativos, porém com valores de *score* inferiores, foram observados para *H. huttiense* CPI103296. Também foi encontrada homologia com a subunidade B da DNA girase de outras bactérias incluindo *Duganellas* sp., *Ralstonia* sp. *Burkholderia* sp. entretanto a identidade foi inferior as descritas para os alinhamentos com *Herbaspirillum*, em torno de 80% ou inferior a esta.

5.2.3 Espectrometria de massa MALDI-TOF

A análises de MALDI-TOF foram realizadas com as 15 estirpes de *Herbaspirillum* cultivadas em meio TSA. Os resultados estão indicados na tabela 5, e figuras 2 a 7.

TABELA 5 - RELAÇÃO MASSA CARGA (M/Z) DOS PICOS OBTIDOS DOS ISOLADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS DE *Herbaspirillum* spp*.
Continua.

Média	Menor	Maior	<i>E. coli</i>	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. linhagem 2 (AV 13965)	H. linhagem 3 (AV 3926)	H. rubrisulbalbicans (M4)	H. lusitanum (P6-12)	H. hitneri (HIL TI)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. fringsingense (GSF-30)	H. fringsingense (AV 14559)	H. seropedicae (Z67)	H. seropedicae (Smr1)	H. seropedicae (AV 14040)
3111.08	3110.5	3111.6		3111.08	3111.23	3111.34	3110.98			3111.15	3110.68	3110.72	3110.5	3111.51	3110.89	3111.19	3111.18	3111.6
3117.29	3117.17	3117.41						3117.17	3117.41									
3348.85	3348.25	3349.32		3348.99	3348.82	3349.16	3348.25	3348.64	3349.32	3348.52	3348.66	3348.88	3348.55	3349.11	3348.94	3348.73	3349.02	3349.14
3558.16	3558.09	3558.24						3558.09	3558.24									
3610.91	3608.09	3611.34		3611.26	3611.2	3611.21	3610.53		3608.09	3611.23	3611	3611.24	3610.99	3611.34	3611	3611.21	3611.17	3611.33
3643.77	3638.09	3644.78	3638.09	3644.14	3644.69	3644.7	3643.46			3643.97	3643.99	3643.93	3644.04	3644.32	3643.99	3644.24	3644.49	3644.78
3707.78	3707.32	3708.33		3707.76	3707.66	3708.1					3707.5				3707.32			3708.33
4161.83	4161.83	4161.83					4161.83											
4172.36	4172.16	4172.56						4172.16	4172.56									
4201.65	4201.2	4202.16		4201.69	4201.93	4201.6	4201.2			4201.62	4201.55	4201.58	4201.32	4201.93	4201.54	4201.62		4202.16
4209.43	4209.33	4209.52						4209.52	4209.33									
4314.9	4311.82	4318.78			4311.82		4317.99			4312.71	4312.22		4312.19	4318.78	4318.59			
4332.78	4332.26	4333.34		4332.72	4332.97	4332.95		4332.26	4333.34	4332.65	4332.64	4332.82	4332.3			4332.98	4332.75	4332.97
4365.19	4365.19	4365.19	4365.19															
4559.5	4559.5	4559.5													4559.5			
4567.44	4567.44	4567.44								4567.44								
4593.38	4592.39	4594.92		4593.38	4593.35		4592.39			4593.13	4593.33	4593.5	4592.62	4594.92	4594.72	4592.49		4593.39
4605.84	4605.52	4606.16								4606.16		4605.52	4605.83					
4613.72	4612.76	4614.3	4612.76						4614.11						4614.3			
4633.78	4633.78	4633.78								4633.78								
4653.97	4653.75	4654.27			4653.9												4654.27	4653.75
4681.91	4681.81	4682.01			4681.81												4682.01	4681.91
4767.88	4767.88	4767.88	4767.88															
4944.34	4943.4	4948.69			4944.16	4944.23	4943.4		4948.69	4944	4943.72		4943.82	4943.58	4943.43			
4963	4961.17	4967.26			4961.59	4961.88		4966.61	4967.26		4961.31		4961.18		4961.17			
4983.92	4983.34	4984.31				4984.31				4984.14	4983.89		4983.65	4984.19	4983.34			
5012.46	5011.68	5012.95			5012.3		5011.68	5012.84	5012.89							5012.12		5012.95

TABELA 5 - RELAÇÃO MASSA CARGA (M/Z), DOS PICOS OBTIDOS PARA ESTIRPES AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *Herbaspirillum* spp*.
Continua.

Média	Menor	Maior	<i>E. coli</i>	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. linhagem 2 (AV 13965)	H. linhagem 3 (AV 3926)	H. rubrisulbalbicans (M4)	H. lusitanum (P6-12)	H. hitneri (HILTI)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. frisingense (GSF-30)	H. frisingense (AV 14559)	H. seropedicae (Z67)	H. seropedicae (Smr1)	H. seropedicae (AV 14040)
5036.6	5036.6	5036.6	5036.6					5036.6										
5044.62	5044.62	5044.62													5044.62			
5052.87	5052.87	5052.87						5052.87										
5064.11	5064.11	5064.11												5064.11				
5095.22	5094.35	5096.08	5096.08					5094.35										
5152.11	5151.42	5152.69		5152.69	5151.6	5152.48	5151.73		5152.19	5151.77	5151.96	5152.52	5152.17	5152.13	5151.42	5152.46	5152.24	5152.16
5193.61	5193.1	5194.05		5193.83	5193.75	5193.94	5193.1		5193.64	5193.42	5193.57	5193.63	5193.36	5193.61	5193.36	5193.61	5193.71	5194.05
5220.05	5219.63	5220.46														5220.46	5219.63	
5233.35	5233.35	5233.35			5233.35													
5240.32	5240.32	5240.32											5240.32					
5245.8	5245.8	5245.8								5245.8								
5380.57	5380.57	5380.57	5380.57															
6184.88	6184.56	6185.24												6184.85		6184.56	6185.24	
6225.93	6225.38	6226.44		6226.19	6226.02	6226.3	6225.38			6225.78	6225.94	6225.94	6225.62	6225.93	6225.72	6225.81	6226.01	6226.44
6238.01	6237.8	6238.21						6237.8	6238.21									
6252.88	6252.32	6253.44	6253.44													6252.32		
6313.7	6313.7	6313.7	6313.7															
6384.36	6384.36	6384.36	6384.36															
6409.15	6409.15	6409.15	6409.15															
6660.99	6659.69	6662.06					6659.69			6660.74		6661.37		6661.56	6660.55	6660.73	6661.21	6662.06
6701.54	6700.86	6702.03		6701.74	6701.74	6701.94	6700.86	6701.38	6701.87	6701.36	6701.48	6701.48	6701.26	6701.54	6701.4	6701.42	6701.63	6702.03
7119.55	7119.34	7119.76						7119.34	7119.76									
7149.95	7149.55	7150.35						7149.55	7150.35									
7157.13	7157.13	7157.13	7157.13															
7181.49	7176.96	7184.9	7180.91	7183.21					7176.96						7184.9			
7208.02	7208.02	7208.02						7208.02										
7219.36	7219.36	7219.36							7219.36									
7225.61	7225.02	7226.15		7225.83	7225.73	7226.05	7225.02			7225.48	7225.49	7225.6	7225.25	7225.61	7225.5	7225.56	7225.67	7226.15

TABELA 5 - RELAÇÃO MASSA CARGA (M/Z), DOS PICOS OBTIDOS PARA ESTIRPES AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *Herbaspirillum* spp*. Continua.

[illegible]

TABELA 5 - RELAÇÃO MASSA CARGA (M/Z), DOS PICOS OBTIDOS PARA ESTIRPES AMBIENTAIS E CLÍNICAS DE *Herbaspirillum* spp*. Conclusão.

Média	Menor	Maior	<i>E. coli</i>	H. Linhagem 1 (AV 14775)	H. linhagem 2 (AV 13965)	H. linhagem 3 (AV 3926)	H. rubrisulbalbicans (M4)	H. lusitanum (P6-12)	H. hitneri (HILTI)	H. huttiense (IAM 14941)	H. huttiense (AV 11883)	H. putei (IAM 15032)	H. putei (AV 13384)	H. frinsingense (GSF-30)	H. frinsingense (AV 14559)	H. seropedicae (Z67)	H. seropedicae (Smr1)	H. seropedicae (AV 14040)
9891.89	9891.17	9893.29			9892.18	9893.29	9891.17			9891.73	9891.86	9891.28	9891.67	9891.88	9892.11	9891.72	9891.95	
9899.91	9899.91	9899.91							9899.91									
9926.02	9925.52	9926.81		9925.64		9926.33				9925.77	9925.87		9925.52	9926.81	9926.18			
9938.08	9937.76	9938.4						9938.4	9937.76									
9971.02	9970.21	9971.43		9971.43		9971.18				9970.92	9970.93	9970.96	9970.21	9971.18	9971.34			
10028.3	10027.3	10029.3			10028.6		10027.3	10028.4	10028.5							10027.8	10028.2	10029.3
10097.9	10097.5	10098.2	10098.2											10097.5				
10130.8	10130.5	10131.1	10130.5											10131.1				
10292	10292	10292	10292															
10483.9	10483.9	10483.9											10483.9					
12757.6	12757.6	12757.6	12757.6															
15300.1	15300.1	15300.1	15300.1															
15390.7	15390.7	15390.7	15390.7															

*dados do ensaio realizado em 16/06/2011.

FONTE: O AUTOR, 2011

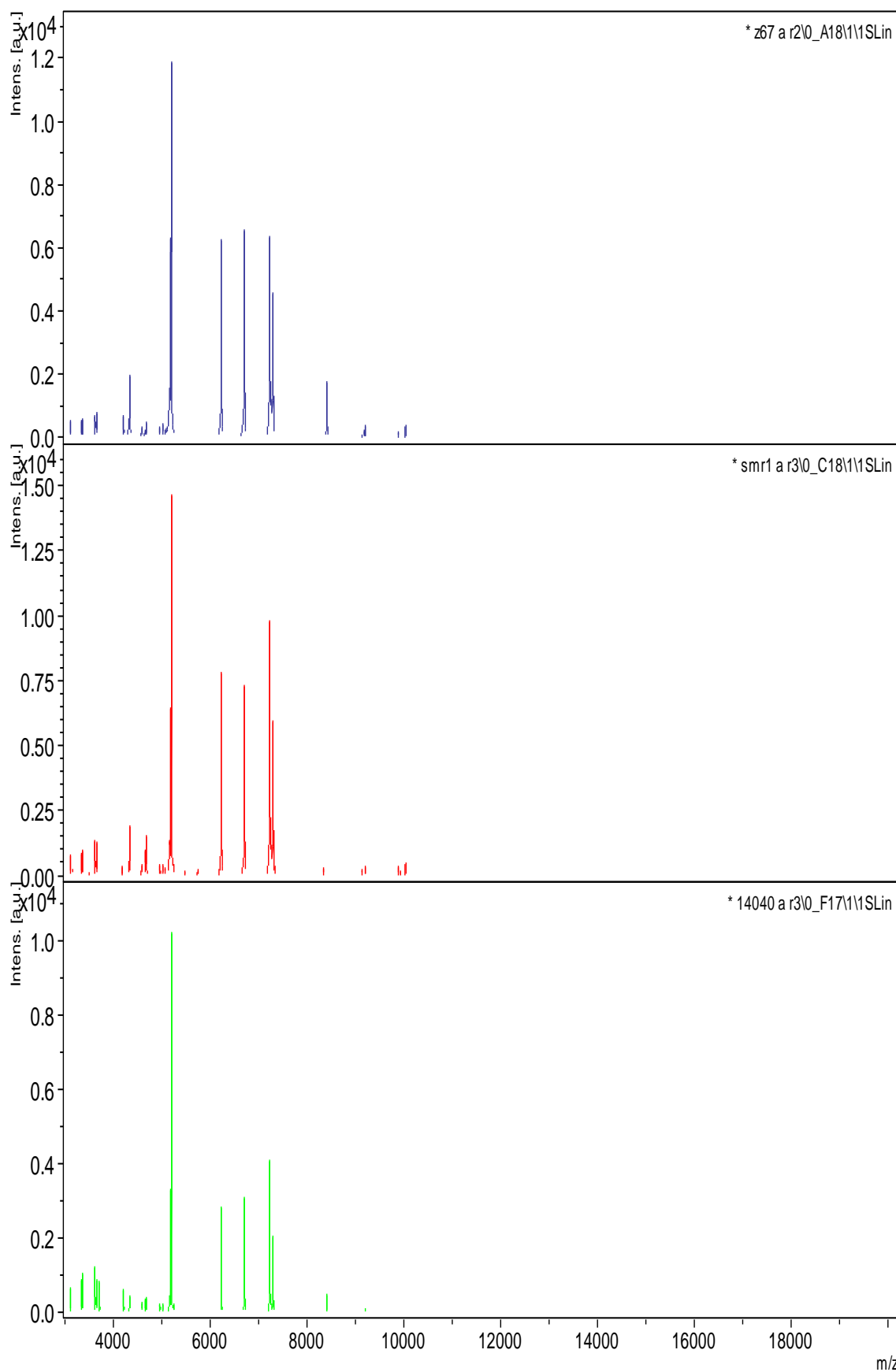


FIGURA 2: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* Z67, Smr1 e AV 14040.
FONTE: O AUTOR, 2011

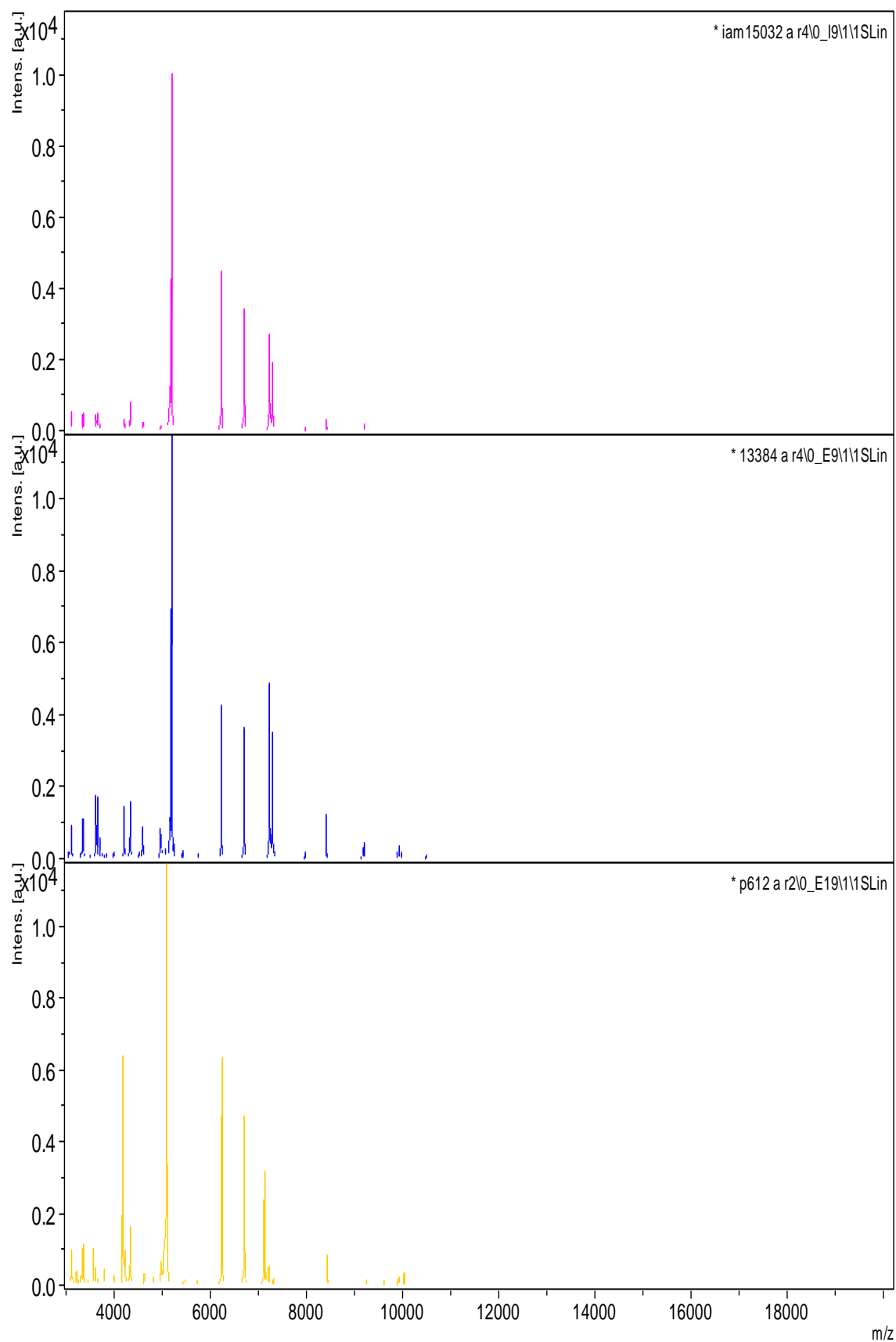


FIGURA 3: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES *H. putei* IAM 15032, AV 13384, e *H. lusitanum* P6-12.
FONTE: O AUTOR 2011.

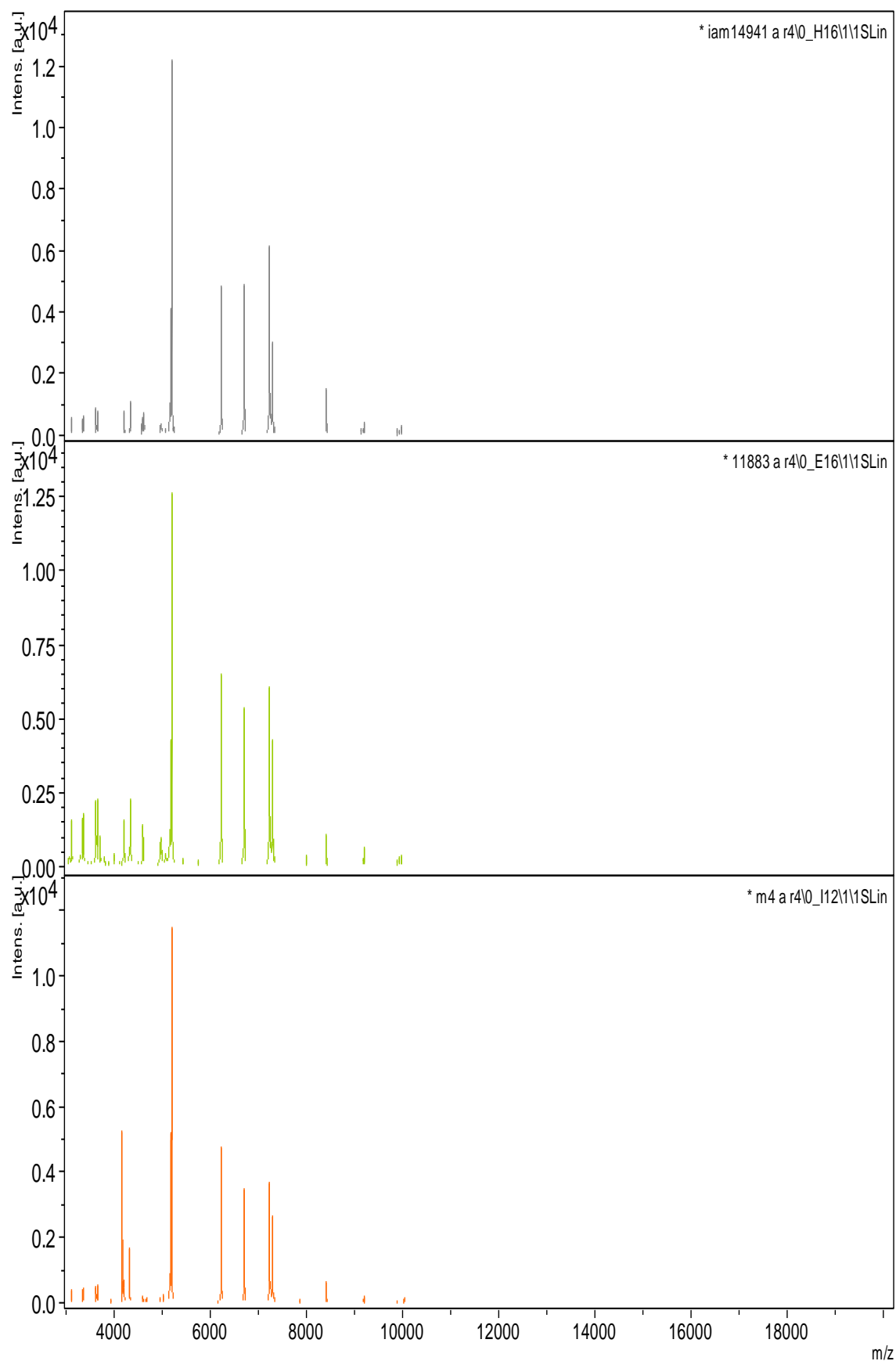


FIGURA 4: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES *H. huttiense* IAM 14941, AV 11883 e *H. rubrisulbalbicans* M4
FONTE: O AUTOR, 2011.

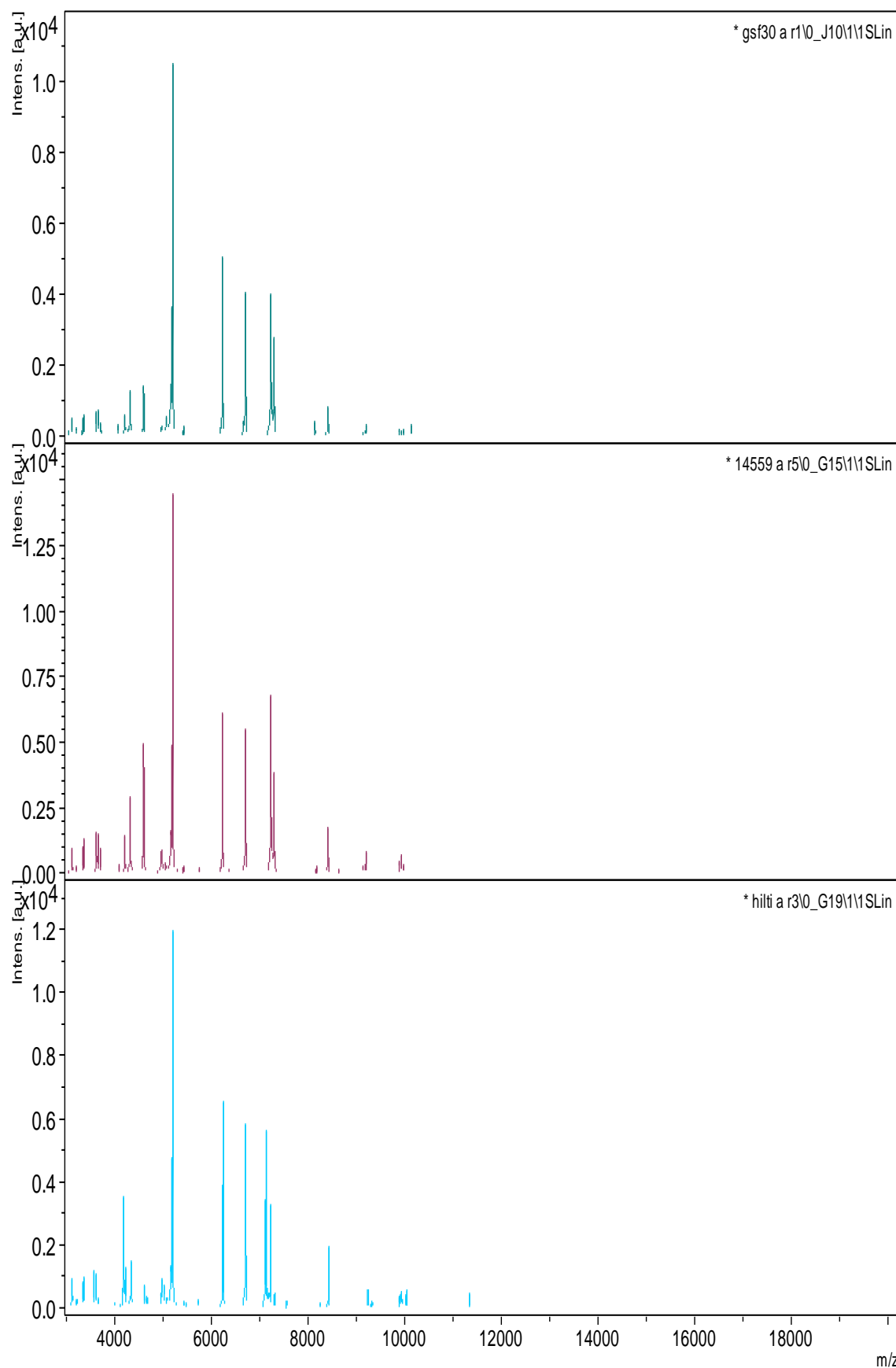


FIGURA 5: ESPECTRO DE MASSA DAS ESTIRPES *H. frisingense* GSF-30, AV 14559 e *H. hiltneri*
 FONTE: O AUTOR, 2011.

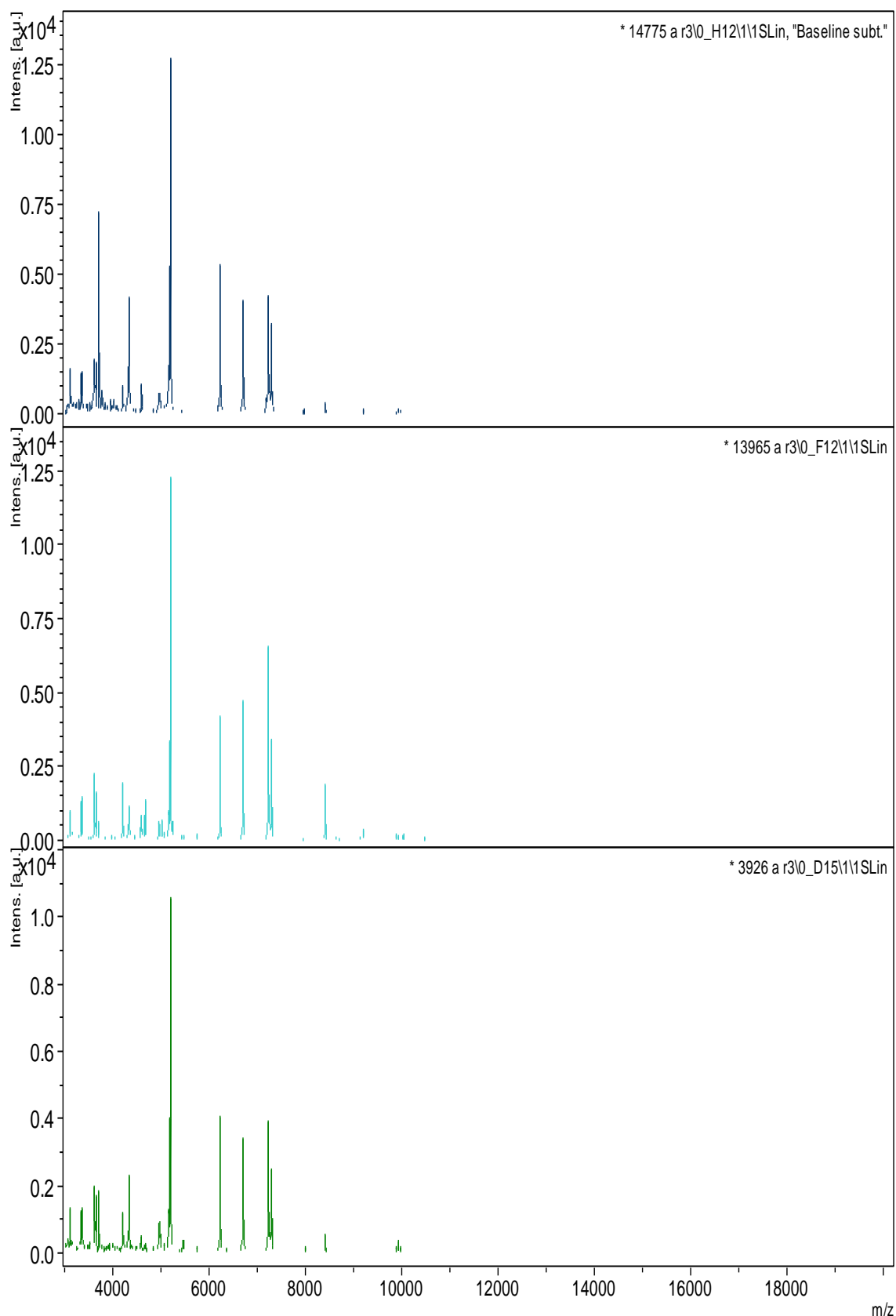


FIGURA 6: ESPECTRO DE MASSAS DAS ESTIRPES *Herbaspirillum* linhagem 1 (AV 14775), *Herbaspirillum* linhagem 2 (AV 13965) e *Herbaspirillum* linhagem 3 (AV 3926).

FONTE: O AUTOR, 2011

Uma série de picos compreendidos entre 3111,08 a 15390,7 foi observada nas estirpes de *Herbaspirillum* sp (tabela 5 e figuras 2 a 6).

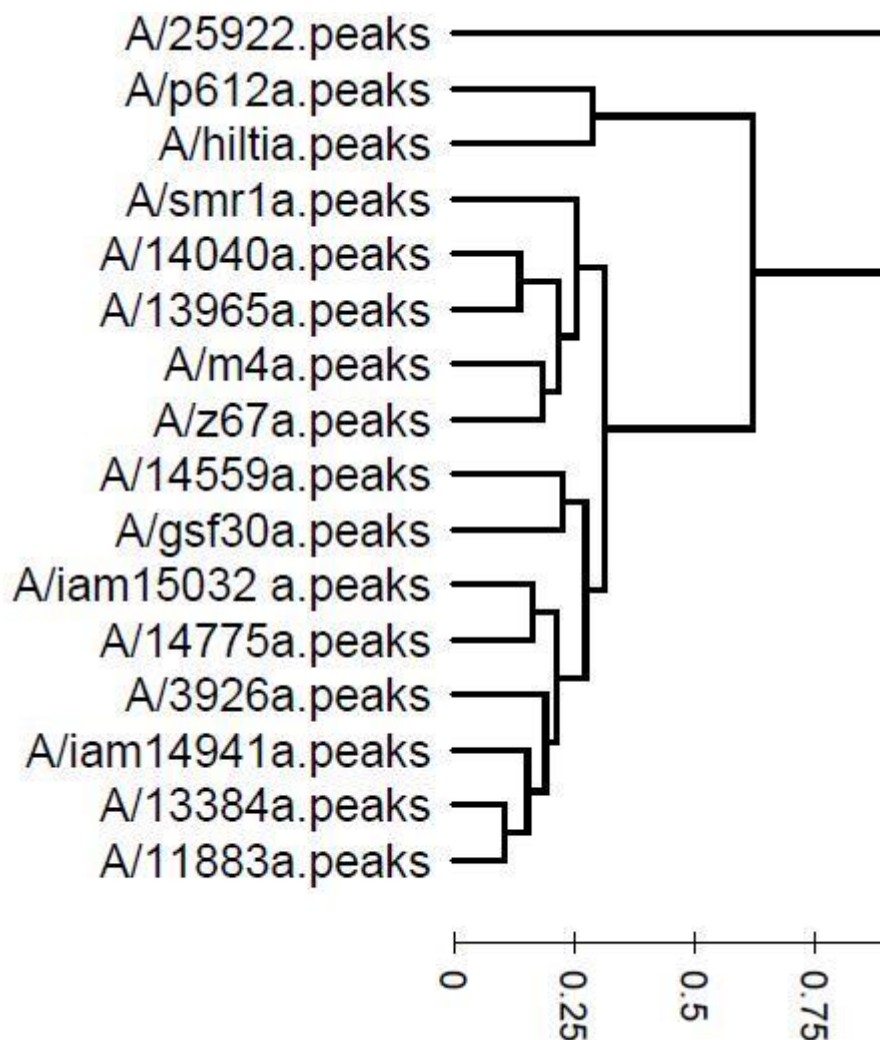


FIGURA 7: DENDROGRAMA GERADO COM OS RESULTADOS DE MALDI-TOF DAS ESTIRPES DE *Herbaspirillum* spp. ESTIRPES: HILTI: *H. hiltneri*, P6-12: *H. lusitanum*, AV 13384: *H. putei*, Smr1: *H. seropedicae*, AV 14040: *H. seropedicae*, Z67: *H. seropedicae*, IAM 15032: *H. putei*, IAM 14941: *H. huttiense*, AV 14775: *H. linhagem 1*, AV 11883: *H. huttiense*, AV 3926: *H. linhagem 3*, M4: *H. rubrisulbalbicans*, AV 13965: *H. linhagem 2*, AV 14559: *H. frisingense*, GSF-30: *H. frisingense*.

FONTE: O AUTOR, 2011.

O dendrograma gerado pelo programa Speclust com base nas análises de MALDI-TOF MS (tabela 5 e figuras 2 a 6), mostra que as estirpes de *Herbaspirillum* sp podem ser distinguidas de *E. coli* e entre si ao nível de espécie e estirpe (figura 7).

5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”

5.3.1 Ensaio de adesão celular utilizando células HeLa

Os ensaios de adesão mostraram que todas as 15 estirpes de *Herbaspirillum* sp apresentaram a capacidade de aderir em células HeLa, como pode ser observado nas figuras 8 a 14.

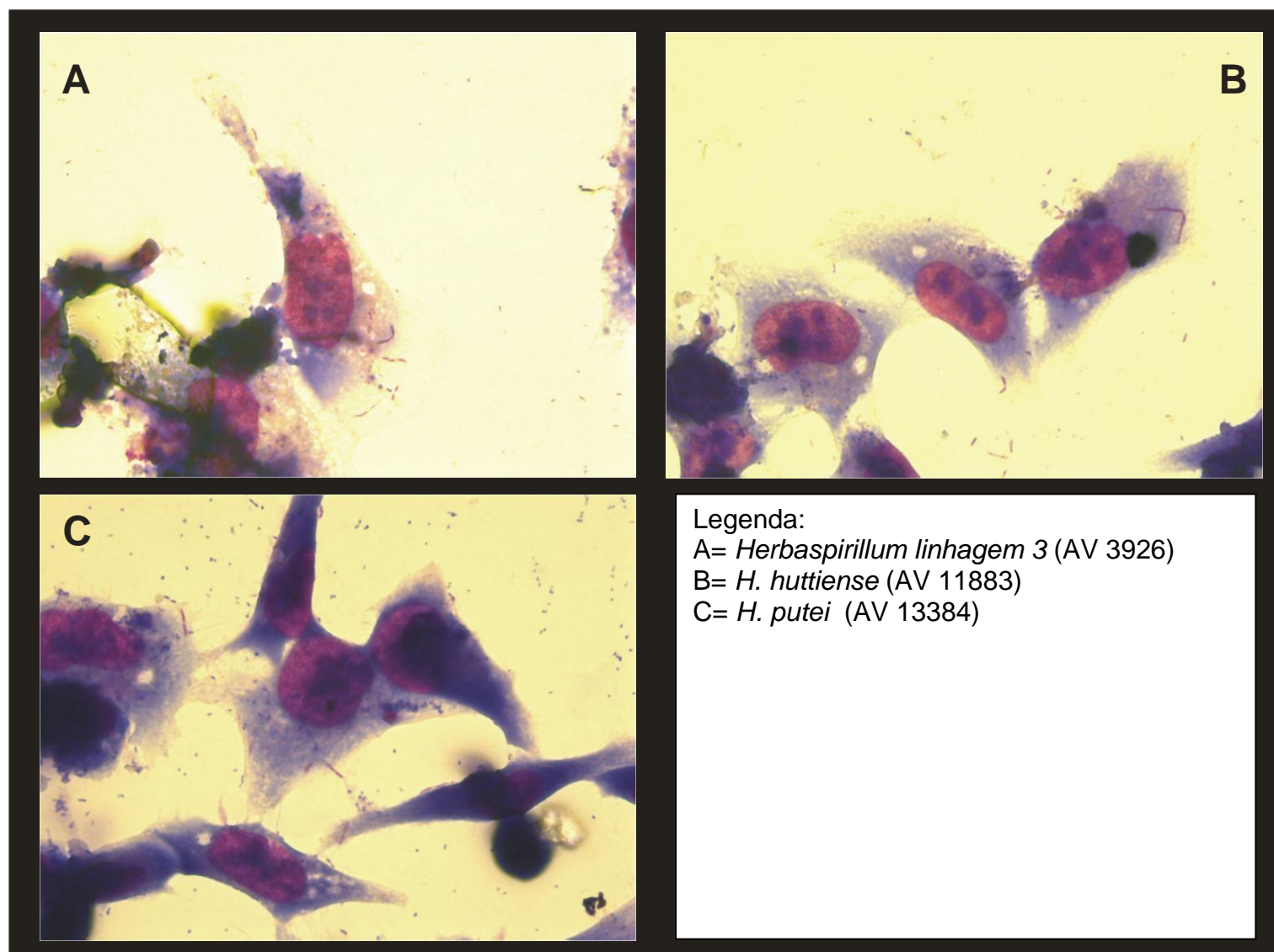


FIGURA 8: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *Herbaspirillum* linhagem 3 (AV 3926), *H. huttiense* (AV 11883); *H. putei* (AV 13384). FONTE: O AUTOR, 2011.

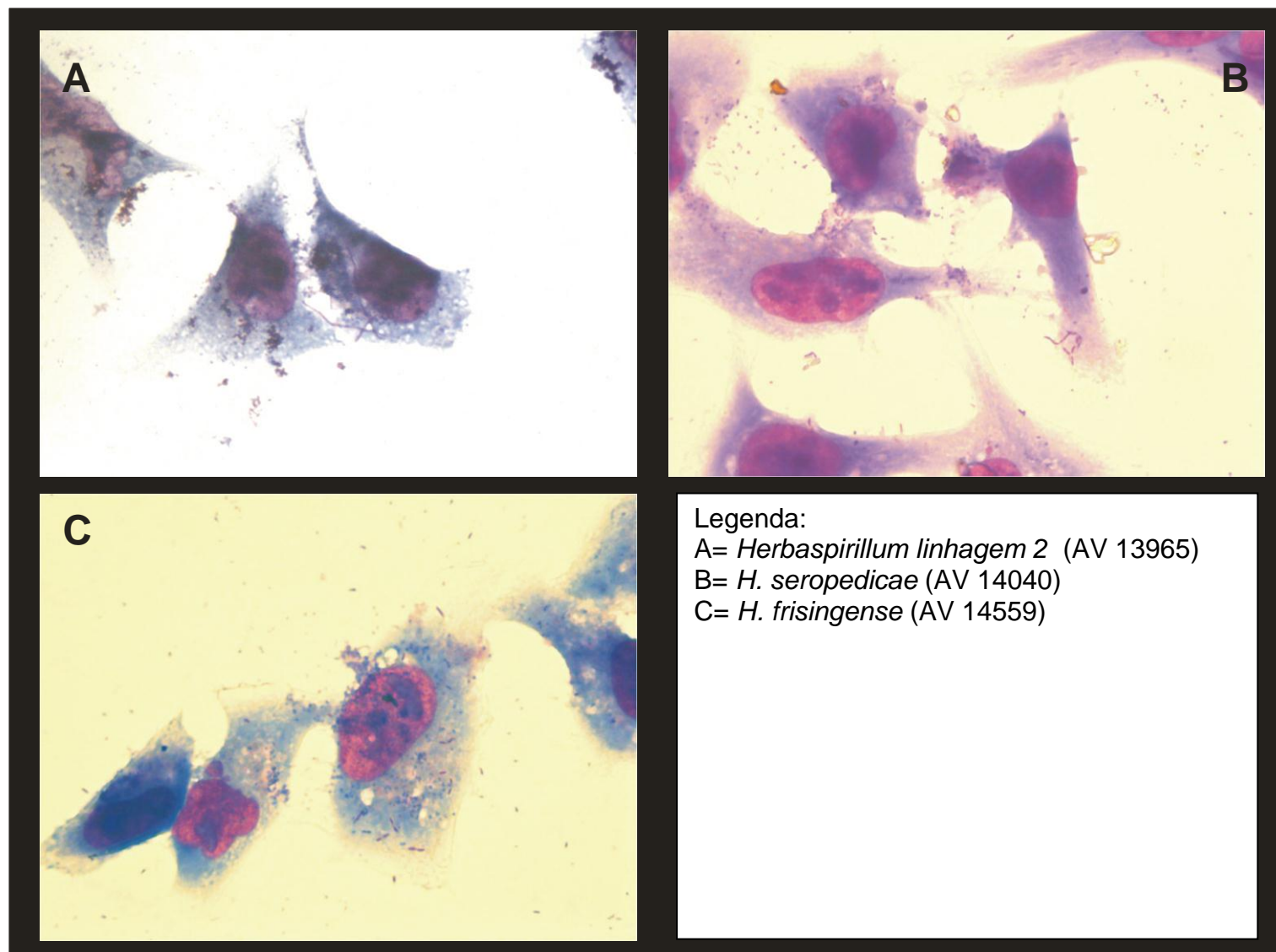


FIGURA 9: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *Herbaspirillum* linhagem 2 (AV 13965), *H. seropedicae* (AV 14040), *H. frisingense* (AV 14559). FONTE: O AUTOR, 2011

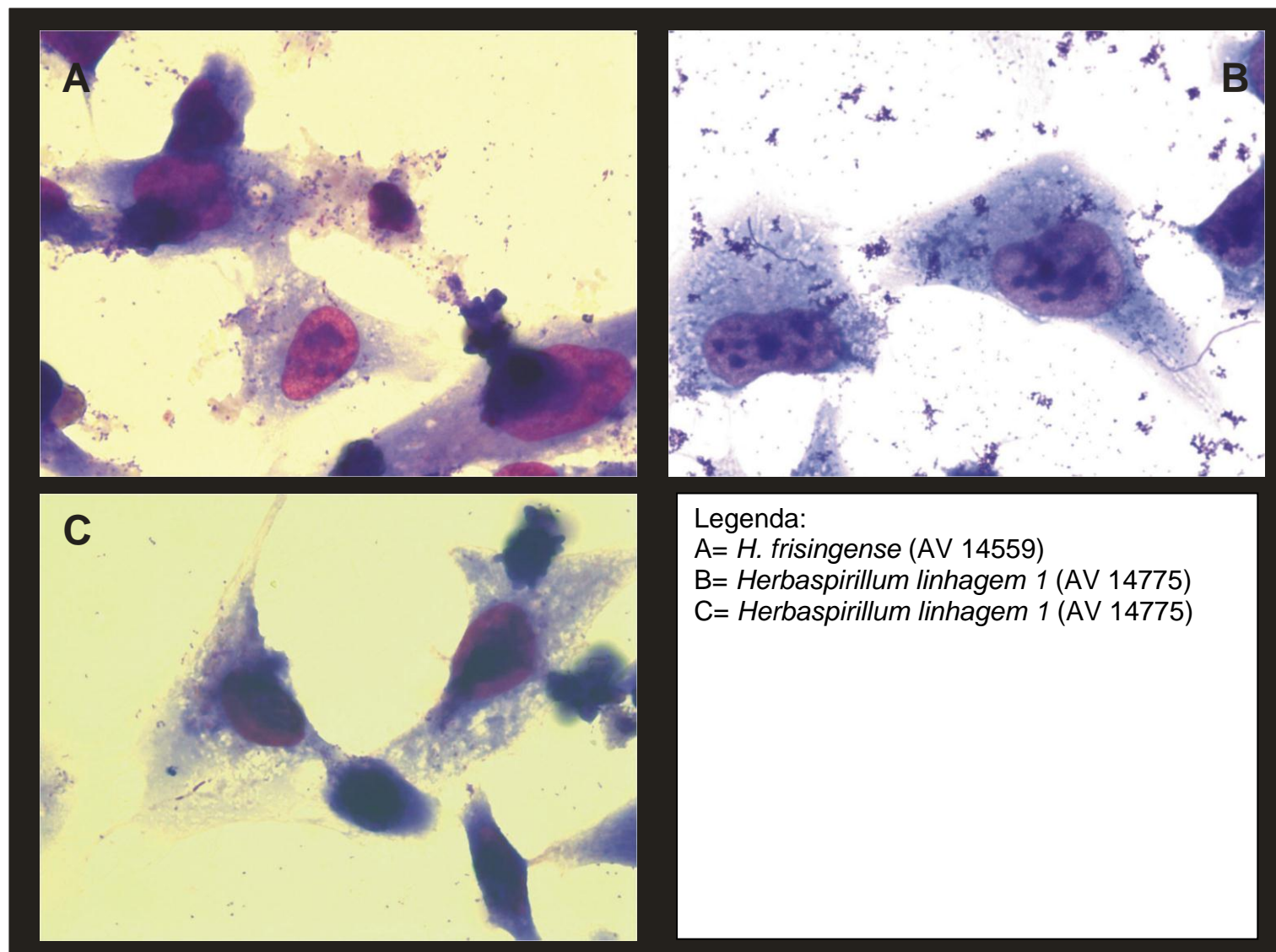


FIGURA 10: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *H. frisingense* (AV 14559) e *Herbaspirillum linhagem 1* (AV 14775).
FONTE: O AUTOR, 2011

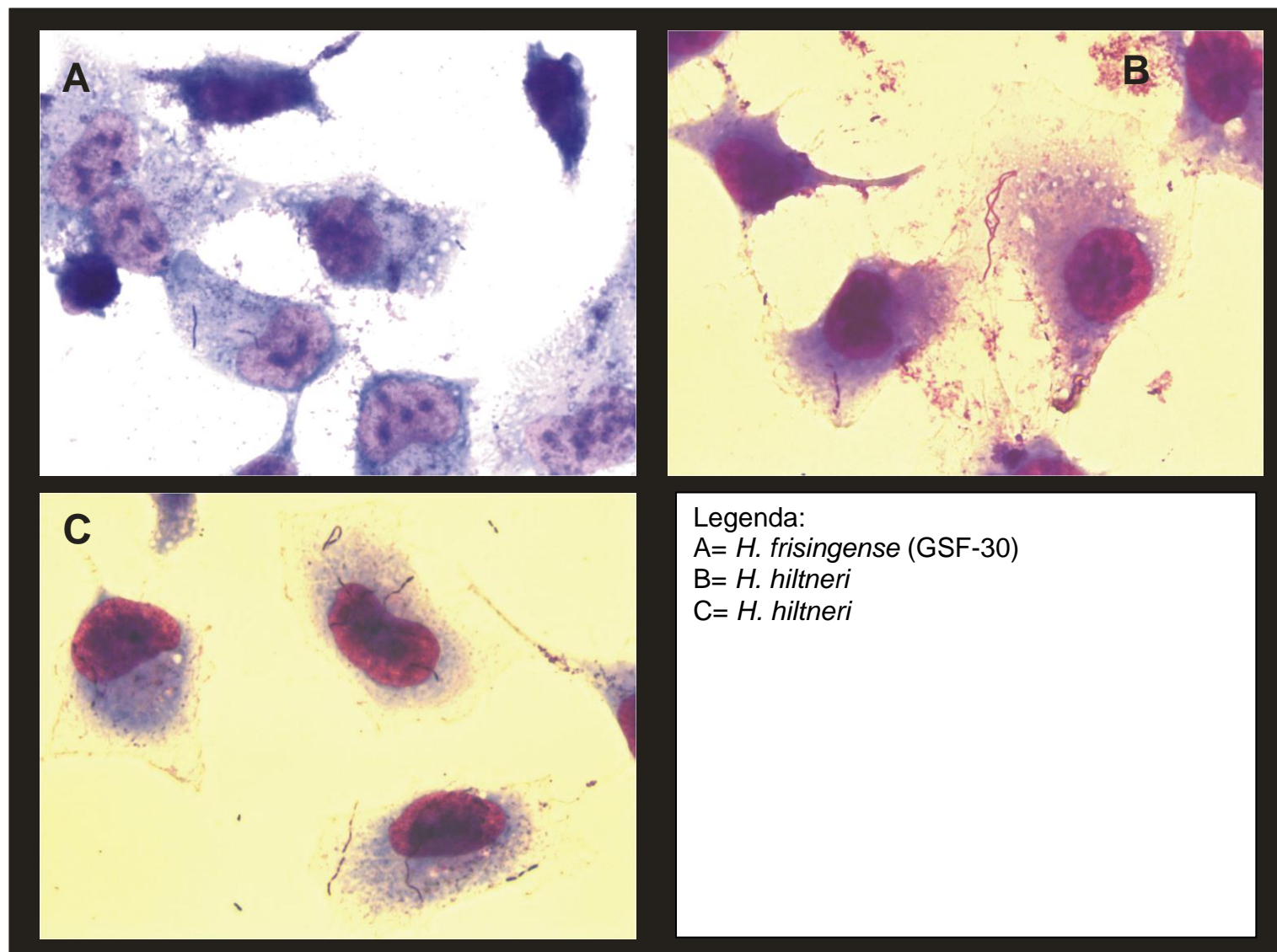


FIGURA 11: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *H. frisingense* (GSF-30) e *H. hiltneri*.
FONTE: O AUTOR, 2011.

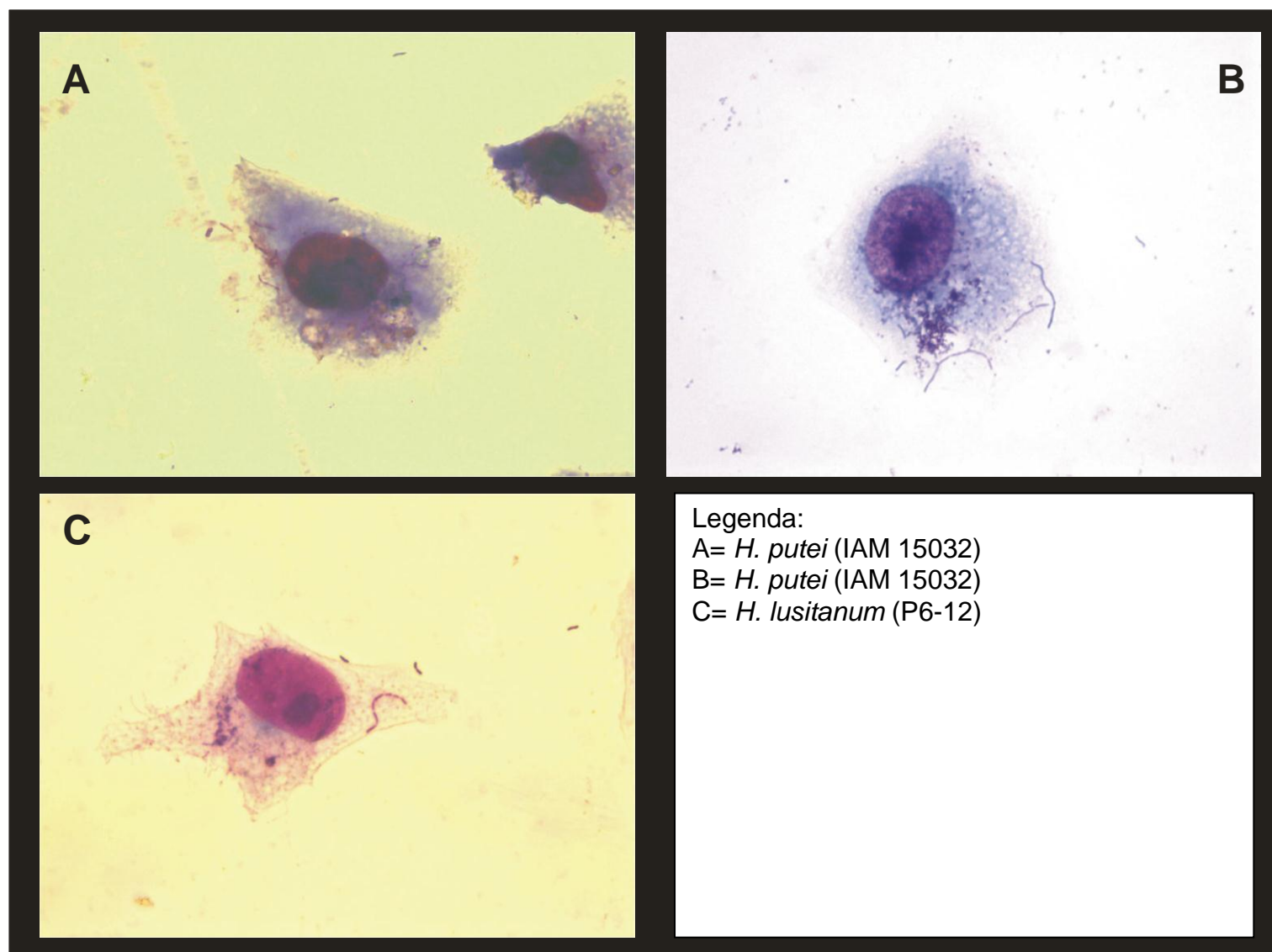


FIGURA 12: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *H. putei* (IAM 15032) e *H. lusitanum* (P6-12).
FONTE: O AUTOR, 2011.

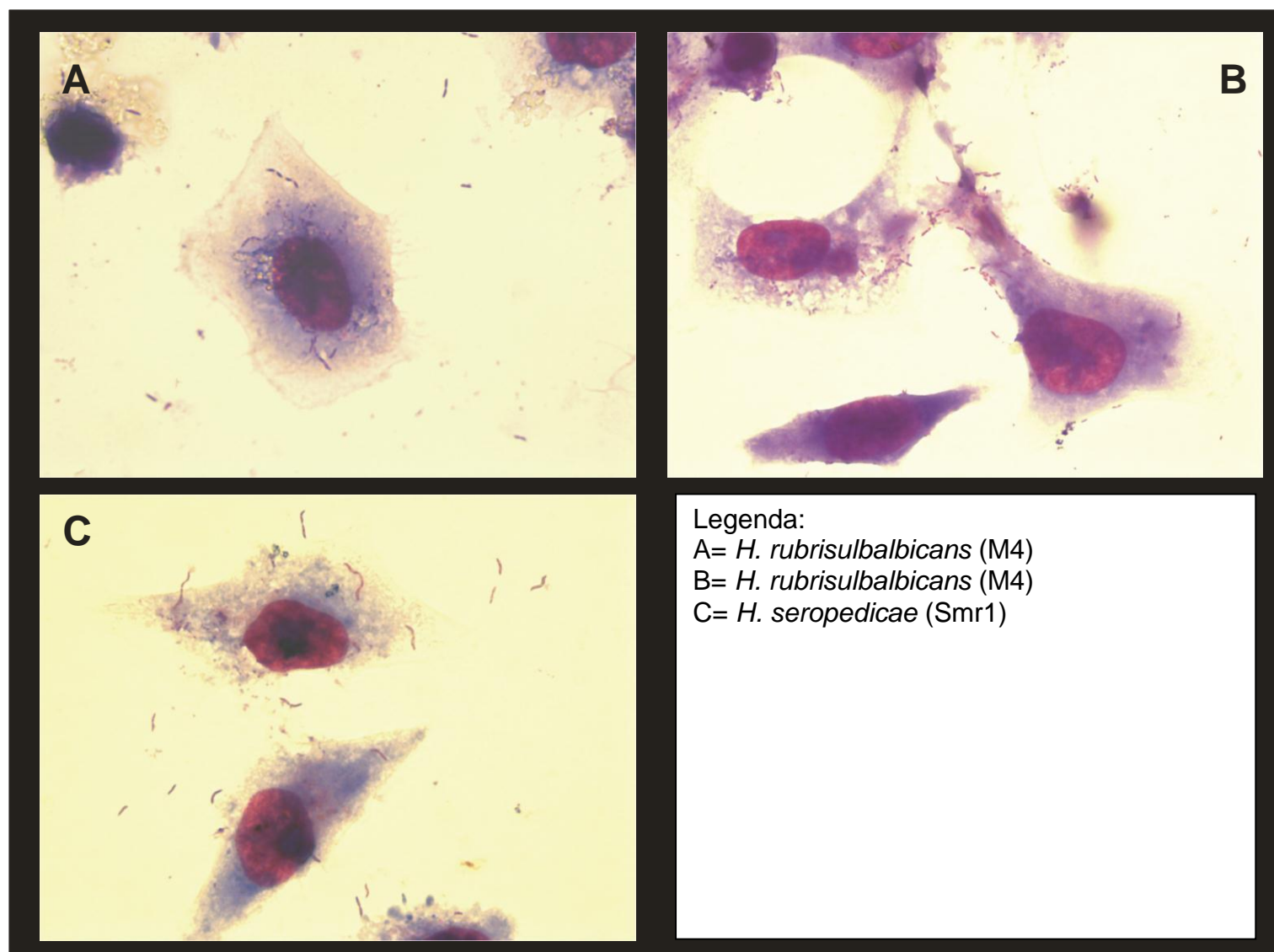


FIGURA 13: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *H. rubrisulbalbicans* (M4) e *H. seropedicae* (Smr1).
FONTE: O AUTOR, 2011.

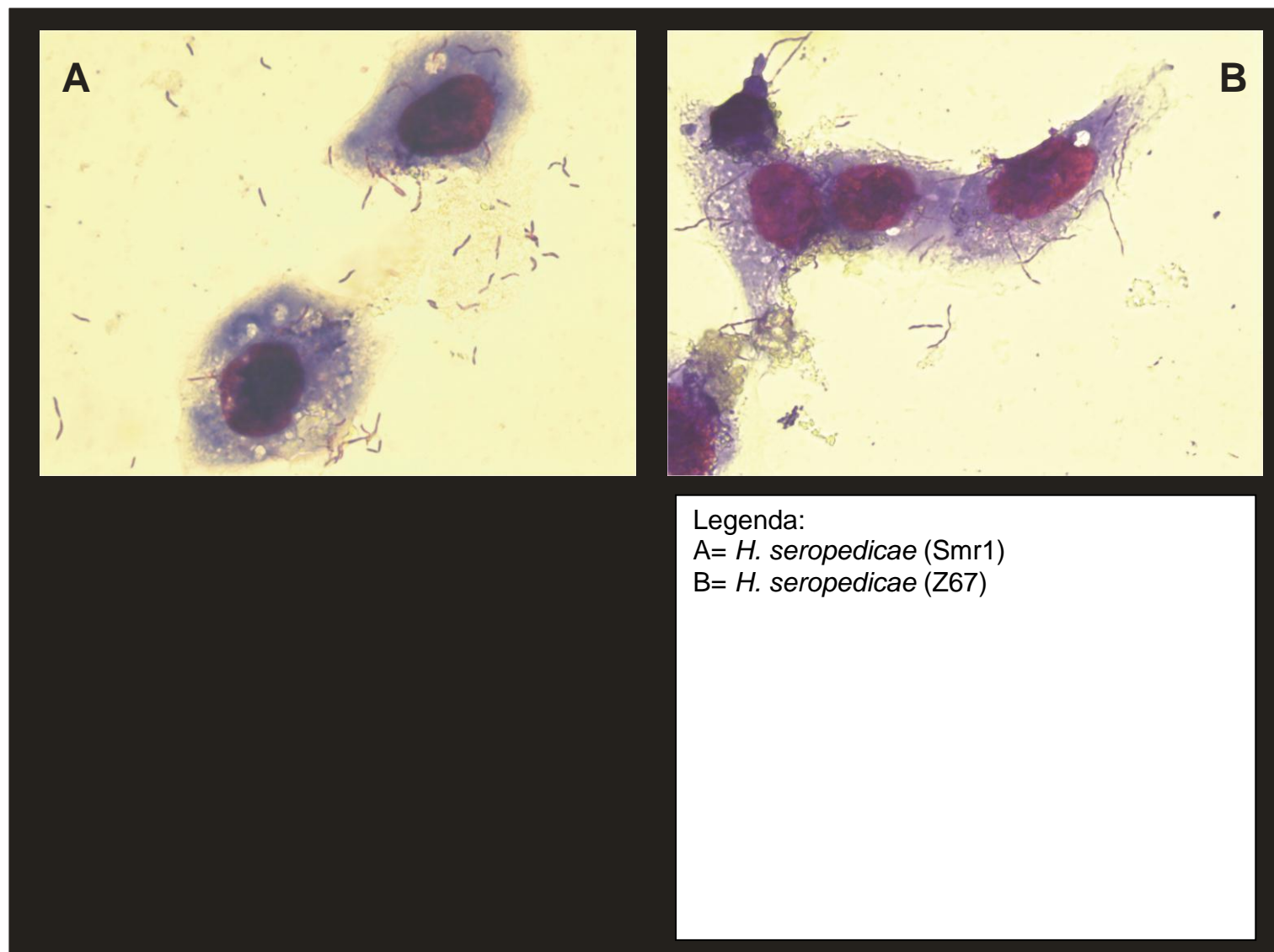


FIGURA 14: ENSAIO DE ADESÃO PARA AS ESTIRPES *H. seropedicae* (Smr1) e *H. seropedicae* (Z67).
FONTE: O AUTOR, 2011.

Para várias estirpes (*H. huttiense* AV 11883, figura 8B; *Herbaspirillum* linhagens 1 e 2, figuras 9A e 10B respectivamente; *H. hiltineri*, figuras 11B e C; *H. putei* IAM 15032 figura 12B; e *H. seropedicae* Smr1 e Z67, figuras 14 A e B) foi observado pleomorfismo. Foram observadas bactérias com morfologia característica de bacilos, bacilos curvos, além de estruturas filamentosas, espiraladas, em “S” ou “asa de gaivota”.

5.3.2 Avaliação do potencial citotóxico de *Herbaspirillum* sobre a linhagem celular Vero

Após 6, 18 e 24 horas de contato das células Vero com as estirpes de *Herbaspirillum* a concentração de formazan, que pode ser utilizada para medir indiretamente a viabilidade celular, foi determinada. Os resultados estão indicados na figura 15.

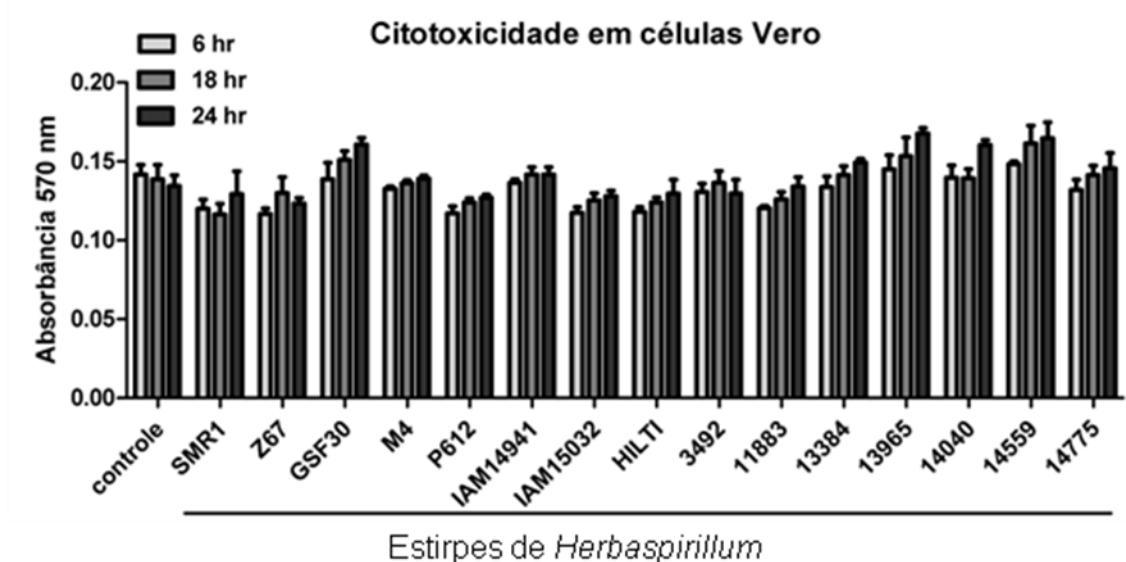


FIGURA 15: ENSAIO PARA AVALIAR O POTENCIAL DE CITOTOXIDADE DE ESTIRPES DE *Herbaspirillum* SOBRE CÉLULAS Vero. A presença de células viáveis é inferida pela metabolização do MTT gerando formazan que é quantificado por espectrofotometria em 570 nm. As barras indicam o desvio padrão.

FONTE: O AUTOR, 2011.

Não foi observada nenhuma diferença estatística na metabolização do MTT entre as células tratadas e as células controle. Isso significa que, nas condições e tempos utilizados para o ensaio, as estirpes de *Herbaspirillum* analisadas não apresentaram atividade citotóxica para a linhagem celular Vero utilizada.

A análise microscópica das células Vero após 6, 18 e 24 horas de contato com *Herbaspirillum* não mostrou alterações morfológicas em relação as células controle (incubadas apenas com TSB), demonstrando, assim como observado para o ensaio de MTT, que não houve indução de citotoxicidade nas condições e tempos utilizados para o ensaio.

5.3.3 Verificação da produção de hemolisina

Os resultados obtidos no ensaio para verificar atividade hemolítica de estirpes de *Herbaspirillum* (figuras 16 e 17), indicam que nenhuma das estirpes testadas foi capaz de induzir hemólise significativa em eritrócitos humanos frescos do tipo “O” e Rh positivo, incubados com culturas bacterianas em diferentes estágios de crescimento (6, 18 e 24 horas).

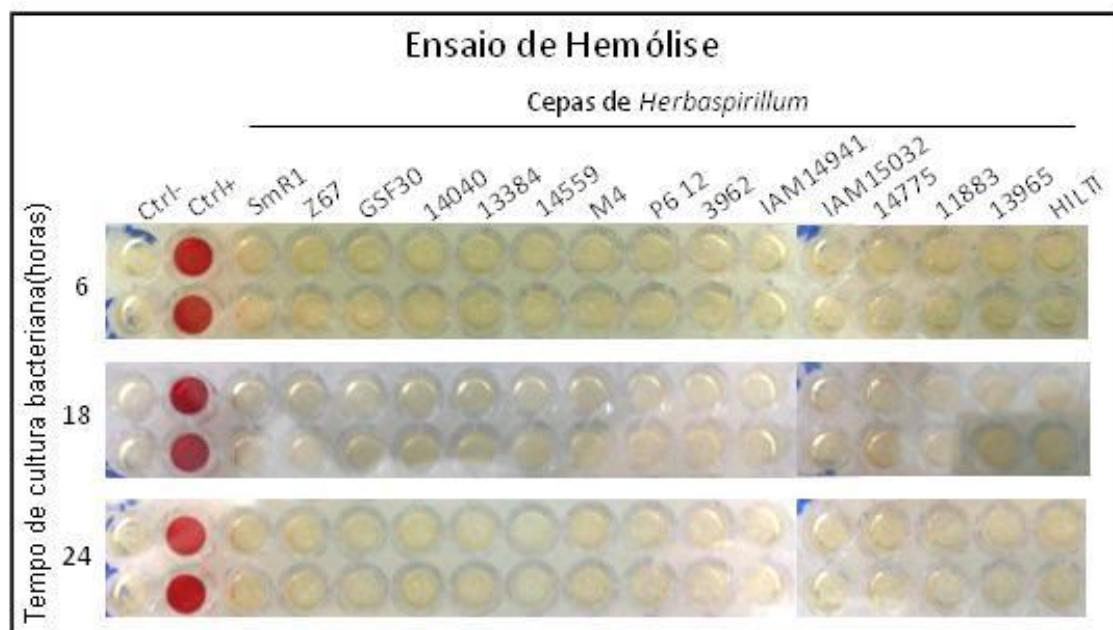


FIGURA 16: ENSAIO DE HEMÓLISE REALIZADO COM ESTIRPES DE *Herbaspirillum*. A figura indica poços de placas de microtitulação contendo os sobrenadantes das misturas de eritrócitos humanos com *Herbaspirillum* spp após 2 horas de incubação. Os números 6, 18 e 24 indicam os tempos nos quais alíquotas de cultivos de *Herbaspirillum* foram coletadas para a realização do ensaio. Ctrl-: sobrenadante da incubação de eritrócitos com meio de cultivo bacteriano (TSB) apenas. Ctrl+: sobrenadante da incubação dos eritrócitos com meio de cultivo bacteriano (TSB) e 0,1% de Triton X-100. FONTE: O AUTOR, 2011.

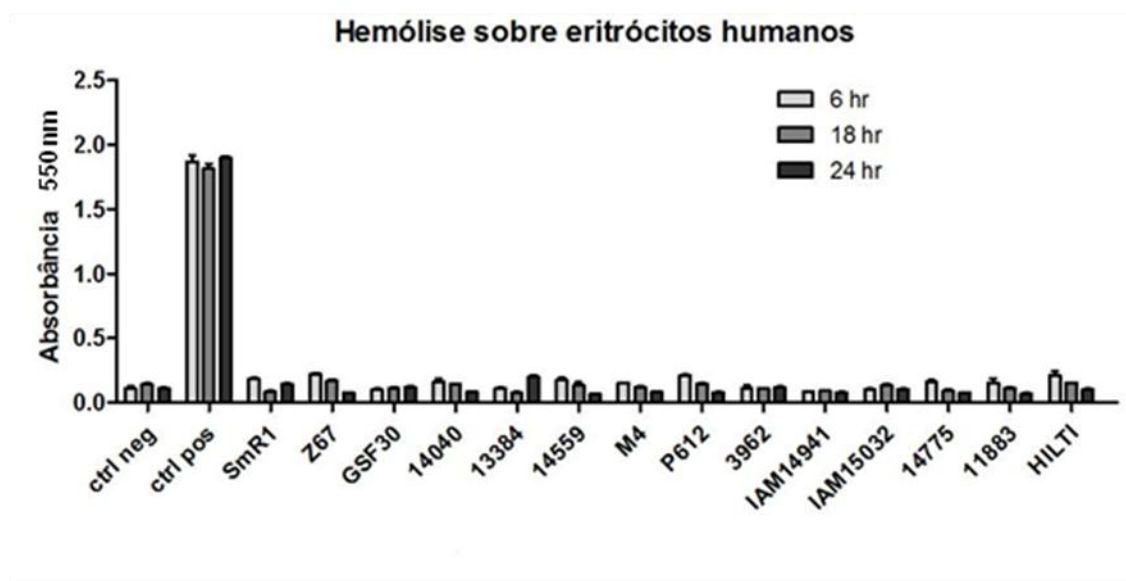


FIGURA 17: ENSAIO DE HEMÓLISE REALIZADO COM ESTIRPES DE *Herbaspirillum*. O gráfico mostra leituras de absorbância em 550 nm do sobrenadante da reação. As barras indicam o desvio padrão.
FONTE: O AUTOR, 2011.

A análise visual das placas contendo os sobrenadantes das reações (figura 15) indica ausência de atividade hemolítica nas estirpes de *Herbaspirillum* sp uma vez que o aspecto é similar ao do controle negativo. Este resultado foi confirmado pela análise espectrofotométrica (figura 16).

6. DISCUSSÃO

As bactérias analisadas neste trabalho incluem quinze estirpes de *Herbaspirillum* das quais oito, *H. seropedicae* estirpes Z67 e Smr1, *H. rubrisulbalbicans* M4, *H. putei* IAM 15032, *H. lusitanum* P6-12, *H. huttiense* IAM 14941, *H. hiltneri* e *H. frisingense* GSF-30, são isolados ambientais. Com exceção de *H. hiltneri*, *H. huttiense* e *H. putei* as demais são diazotróficas. As outras sete estirpes, *H. frisingense* AV 14559, *H. huttiense* AV 11883, *H. putei* AV 13384, *H. seropedicae* AV 14040, *Herbaspirillum* linhagem 1 AV 14775, *Herbaspirillum* linhagem 2 AV 13965 e *Herbaspirillum* linhagem 3 AV 3926, foram isoladas de amostras clínicas de pacientes com fibrose cística. O sequenciamento do gene 16S rRNA destas bactérias indicou identidade superior a 95% com 16SrRNA de *Herbaspirillum*, a identificação até espécie foi feita quando a identidade foi 99,5% ou superior. Com base nessas análises foram identificadas as espécies citadas acima, mas não foi possível atribuir uma espécie para algumas daquelas estirpes, que parecem representar três linhagens distintas. Uma delas apresentou 99% de similaridade com *H. huttiense* e *H. putei*, as outras parecem representar novas espécies de *Herbaspirillum* (SPILKER et al., 2008).

6.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

O gênero *Herbaspirillum* foi proposto por Baldani e colaboradores (1986), que então descreveram a espécie *H. seropedicae* e a estirpe Z67 como a espécie tipo. As bactérias foram descritas como bacilos gram negativos vibrióides a espiralados, móveis; oxidase, catalase e urease positivos, e incapazes de fermentar açúcares. Ácidos orgânicos foram as fontes de carbono preferenciais, mas glucose, frutose, galactose, L-arabinose, manitol, sorbitol e glicerol também foram usados. Amido e gelatina não foram hidrolisados, e foi observada a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, mas não a produção de gás a partir do nitrato (BALDANI et al., 1986).

As bactérias analisadas neste trabalho, tanto as estirpes ambientais quanto as isoladas de humanos, foram caracterizadas como bacilos gram negativos, não fermentadores de glucose, oxidase positivos e móveis. Apresentaram metabolismo oxidativo, foram capazes de formar ácido a partir da glucose, mas essa foi uma característica variável para outros carboidratos. Foram capazes de utilizar a uréia e o citrato, mas não a gelatina (tabela 2), características estas similares às previamente descritas por Baldani e colaboradores (1986), para o gênero *Herbaspirillum*.

Outras provas convencionais, realizadas no presente trabalho, com resultados positivos, e comuns a todas as estirpes analisadas, foram o crescimento em meio TGY entre 25 e 36°C, crescimento em ágar MacConkey, crescimento em caldo nutriente em concentrações de 0 à 2% de NaCl, oxidação do glicerol, manitol, arabinose e xilose.

Todas as estirpes foram negativas para a produção de H₂S (TSI), redução do nitrato à gás, indol, esculina, fenilalanina desaminase, descarboxilação da lisina e ornitina, hidrólise da gelatina, crescimento em ágar SS e cetrimide, crescimento em caldo nutriente com $\geq 4\%$ de NaCl, oxidação da sacarose e maltose (tabela 2).

Dez dos substratos utilizados neste trabalho para verificação de utilização de fonte de carbono estavam representados nas placas Biolog® GN2 e também nos ensaios convencionais, sendo eles: L-arabinose, D-frutose, D-glucose, D-lactose, maltose, D-manitol, L-ramnose, sacarose, D-trealose e glicerol. Para os substratos maltose e sacarose foram obtidos resultados semelhantes (negativos) tanto nas provas convencionais quanto nas micro-placas Biolog® (tabelas 2 e 3).

Entretanto algumas diferenças entre os resultados dos dois sistemas foram observadas. A mais comum foi referente à variação na intensidade da resposta, ou seja: resultado fracamente positivo em um dos sistemas de identificação e positivo no outro. Isto pode ser devido aos diferentes indicadores utilizados nos dois sistemas e/ou ao tempo de incubação, sete dias para o sistema convencional e 48 horas para o Biolog.

Para o substrato L-ramnose diferenças foram observadas, repetidas vezes, entre os dois sistemas para a estirpe Smr1; o resultado foi negativo no método convencional e positivo no Biolog. Apenas três das estirpes, linhagem

2, e as estirpes Smr1 e 14040 de *H. seropedicae* apresentaram resultados positivos para ramnose no Biolog. No sistema convencional a estirpe 14040 apresentou resultado positivo, enquanto a linhagem 2 um resultado fracamente positivo, o que poderia sugerir que as condições para determinar a capacidade de utilizar a ramnose sejam favorecidas no Biolog.

Para a D-lactose o resultado da estirpe AV 14775 (linhagem 1) foi positivo no sistema convencional e negativo no Biolog, ao passo que para GSF-30 (*H. frinsingense*) o resultado foi fracamente positivo no sistema convencional e negativo pelo Biolog. Já para as estirpes IAM 14941, AV 11883, AV 13384, AV 14559, negativas para a D-lactose no sistema Biolog, não foi possível afirmar o resultado da prova no sistema convencional (tabelas 2 e 3). Isto foi devido ao fato de que o resultado observado não foi alcalino como ocorrido no tubo controle (sem lactose), tampouco houve uma reação ácida bem definida. Considerando que todas essas bactérias apresentaram resultados positivos para ONPG, e que mesmo as reações positivas e fracamente positivas para a lactose foram observadas apenas após o quinto dia de incubação, é possível que o transporte da lactose ocorra lentamente comprometendo esta análise.

Para a D-trealose a estirpe AV 11883 apresentou resultado fracamente positivo no sistema convencional e negativo no Biolog (tabelas 2 e 3), o que pode ser devido às diferenças no tempo de incubação (sete dias para o sistema convencional e 48 horas para o Biolog).

Os sistemas convencionais de identificação são amplamente utilizados nos laboratórios clínicos, apresentam menor custo, mas são laboriosos e uma série de meios precisa ser inoculada. Além disso, a padronização inter-laboratório é difícil, e para muitos microorganismos vários dias podem ser necessários para a identificação bacteriana (MACFADDIN, 2000; ASLANZADEH, 2006). É o caso do grupo dos BGN-NF, no qual está incluído o gênero *Herbaspirillum*. Para a identificação dessas bactérias vários testes devem ser incubados por até 7 dias para a interpretação dos resultados (SCHRECKENBERGER et al., 2007).

A necessidade de padronizar os ensaios bioquímicos e agilizar o processo de identificação bacteriana impulsionou o surgimento dos kits comerciais (JAMNNEs e DE VOS, 2006). Estes sistemas se baseiam na

miniaturização de provas e permitem a inoculação simultânea de uma série de testes, reduzindo o tempo de trabalho (ASLANZADEH, 2006; JAMNINES e DE VOS, 2006).

Vários kits comerciais foram adaptados ou desenvolvidos para a identificação dos BGN-NF. São fáceis de usar, apresentam maior duração que os testes convencionais, e não requerem o preparo de meios de cultivo. A metodologia é padronizada e em geral fornece resultados acurados e reproduzíveis iguais ou melhores que os ensaios convencionais. Problemas inerentes ao uso de muitos dos kits comerciais atualmente disponíveis para a identificação dos não-fermentadores incluem a tendência dos organismos que apresentam reações bioquímicas fracas ou demoradas produzirem resultados falso-negativos; composição sub-ótima de muitos sistemas para o cultivo de certos não-fermentadores, e a inclusão de alguns testes diferenciais que podem não ser aplicáveis à identificação dos não-fermentadores. Enquanto os membros da família *Enterobacteriaceae* geralmente crescem rapidamente e mostram forte atividade enzimática sobre uma variedade de substratos que podem ser prontamente detectados nesses sistemas de identificação comerciais, a maioria das espécies dos não-fermentadores crescem mais lentamente e são relativamente inativos enzimaticamente. É necessário considerável experiência para interpretar reações fracas ou incompletas que podem ser encontradas nesses sistemas (WINN et al., 2006.)

Enquanto que nos ensaios convencionais muitas das reações se baseiam no acúmulo de produtos do metabolismo que provocam a viragem de indicadores de pH (MACFADDIN, 2000), no sistema Biolog a interpretação das provas é baseada na redução do indicador violeta de tetrazólio (incolor) em um composto de coloração roxa, que indica a oxidação/utilização do substrato (MILLER e RHODEN, 1991; ASLANZADEH, 2006). Isto facilita a interpretação dos ensaios uma vez que o surgimento da coloração roxa indica um resultado positivo, enquanto que nos testes convencionais uma série de indicadores distintos é utilizada. Entretanto, a interpretação visual dos resultados fracamente positivos é difícil em ambos os sistemas.

Para *H. seropedicae* estirpes Z67, Smr1 e AV 14040, a maioria dos resultados dos ensaios microbiológicos convencionais foram similares àqueles descritos por Baldani e colaboradores (1986). Contudo, algumas diferenças

foram encontradas. A reação da catalase foi variável entre as estirpes de *H. seropedicae*: negativa para Smr1 e fracamente positiva para Z67 e AV 14040. Outra diferença foi observada em relação ao crescimento a 42°C, que foi verificado para as estirpes Smr1 e o isolado humano AV 14040, ao passo que Z67 não foi capaz de crescer nessa temperatura. Este dado confirma os achados de Baldani e colaboradores (1986), que mostraram que a estirpe Z67 cresce na faixa de 22 a 38°C, mas não a 40°C. Todas as estirpes de *H. seropedicae* foram capazes de crescer em 2% de NaCl, diferente do observado por Baldani e colaboradores. Esta diferença provavelmente se deve aos meios de cultura empregados para a realização dos ensaios: o NFb foi utilizado por Baldani e colaboradores, ao passo que o caldo nutriente, que apresenta uma composição mais rica, foi empregado neste trabalho.

Uma diferença entre as três estirpes de *H. seropedicae* foi observada em relação ao teste da arginina dihidrolase: Z67 apresentou resultado positivo, diferente do que foi observado para as outras duas estirpes (tabela 2). Além disso, a estirpe AV 14040 isolada de humanos pode ser diferenciada das outras duas pela incapacidade de fixar nitrogênio.

Em 1996 Baldani e colaboradores acrescentaram mais informações sobre *H. seropedicae*, além de descrever duas novas espécies do gênero: *H. rubrisubalbicans* e outra designada *Herbaspirillum* species 3, contendo principalmente estirpes de origem clínica. As três espécies foram diferenciadas com base nas características bioquímicas, hibridização DNA-DNA, e na incapacidade de fixar nitrogênio que distinguiu *Herbaspirillum* species 3 das demais. As estirpes diazotróficas puderam ser diferenciadas com base nas reações frente ao meso-eritritol e N-acetilglucosamina. As bactérias foram analisadas quanto às suas características bioquímicas utilizando o sistema comercial API, tiras API 50CH, 50A0 e 50AA. Todas as estirpes foram capazes de utilizar os seguintes substratos (estão indicados apenas os que também são representados no sistema Biolog): glicerol, L-arabinose, D-glucose, D-frutose, D-manose, manitol, sorbitol, xilitol, L-leucina, L-treonina, adonitol, D-galactose, L-fucose, D-arabitol, L-prolina e D-fucose. Apresentaram resultados negativos para maltose, celobiose, sacarose, trealose, rafinose, fenilalanina e L-histidina (BALDANI et al., 1996). Resultados similares foram observados para Smr1 e AV14040, as duas estirpes de *H. seropedicae* que foram analisadas com o

sistema Biolog. Para as provas eritritol, N-acetilglucosamina, L-ramnose e meso-inositol as respostas observadas foram iguais às descritas por Baldani e colaboradores (1996) para *H. seropedicae* Z67 (tabela 3).

A espécie *H. rubrisubalbicans* foi analisada apenas através do sistema convencional, no qual foi possível observar reações positivas para o glicerol, L-arabinose, D-xilose, D-glucose, D-frutose, manitol, e negativos para maltose, sacarose, trealose, ramnose e lactose, similar aos descritos por Baldani e colaboradores (1996). A bactéria apresentou reação da catalase negativa e foi capaz de crescer a 42°C (tabela 2).

Os resultados para a estirpe *H. lusitanum*, analisada apenas pelo sistema convencional (tabela 2) demonstram similaridade com os resultados em comum disponíveis em literatura. Uma única diferença foi observada em relação a prova de arginina dihidrolase, interpretada como fracamente positiva neste trabalho e negativa na literatura (VALVERDE et al., 2003). Isto é devido ao uso de sistemas distintos, o kit comercial API NE e o sistema convencional, que apresentam sensibilidades diferentes.

Para as estirpes de *H. frisingense* foram obtidos resultados de catalase fracamente positivo e negativo respectivamente para as estirpes AV 14559 e GSF-30. Ambas as estirpes foram positivas para arabinose, frutose, D-glucose, glicerol, manitol, xilose e negativas para ramnose e para os dissacarídeos sacarose, trealose e maltose, assim como descreve a literatura acerca dos resultados fenotípicos para a espécie e da informação de que são incapazes de metabolizar di e tri-sacarídeos (KIRCHHOF et al, 2001). Contudo os resultados obtidos para o dissacarídeo lactose foi indeterminado para a estirpe AV 14559 e fracamente positivo para estirpe GSF-30 (Tabela 2). Os resultados obtidos pelo sistema Biolog® GN2 para estirpe AV 14559, foram similares aos descritos por Kirchhof e colaboradores (2001), com exceção da oxidação do adonitol (tabela 3), o que pode indicar diferenças metabólicas entre as estirpes.

Para as estirpes ambiental (IAM 14941) e clínica (AV 11883) de *H. huttiense*, os resultados dos ensaios convencionais (tabela 2), estão em concordância com os descritos (LEIFSON, 1962), com exceção daqueles observados para a reação de catalase, fracamente positiva para a estirpe clínica o que indica uma diferença entre membros desta espécie.

Na metodologia convencional (tabela 2) ambas as estirpes de *H. putei* apresentaram resultados idênticos na maioria das provas. Variações foram observadas nas provas de catalase, crescimento em TGY a 42°C, arginina dihidrolase e lactose, que mostram diferenças no comportamento dos isolados clínico e ambiental. O mesmo foi observado para Dextrina, Tween 40, ácido D-galactônico lactona P, ácido D-glucosaminico, Ácido α -hidroxibutírico, Ácido malônico, L-alaninamida, D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, L-leucina, L-serina, L-treonina, no sistema Biolog®.

A estirpe *H. hiltneri* foi analisada apenas através do sistema convencional, no entanto estes dados não foram comparados com os da literatura já que apenas resultados de sistemas comerciais estavam disponíveis (ROTHBALLER *et al.*, 2006).

Alguns relatos sobre a associação de estirpes de *Herbaspirillum* com doenças em humanos datam da década de 80 (BALDANI *et al.*, 1986). Mas só recentemente, através do sequenciamento do gene 16S rRNA essas bactérias tem sido identificadas em amostras de vários pacientes (TAN e OEHLER, 2005; SPILKER *et al.*, 2008 CHEN *et al.*, 2010; ZIGA *et al.*, 2010), e a sua possível atuação como patógeno tem sido considerada.

Atualmente poucas informações estão disponíveis sobre o gênero *Herbaspirillum* nos textos de microbiologia clínica, e apenas as características de *Herbaspirillum* species 3 são citadas nos livros textos (SCHRECKENBERGER e LINDQUIST 2007, SCHRECKENBERGER *et al.*, 2007, WINN *et al.*, 2006).

É possível que bactérias do gênero *Herbaspirillum* não estejam sendo detectadas como agentes associados a infecções humanas nos laboratórios clínicos devido a dificuldades para a sua identificação. Fazem parte do grupo dos bacilos gram negativos não fermentadores, um grupo extenso e heterogêneo dos quais alguns poucos entre os quais *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* são mais frequentemente isolados nos laboratórios clínicos.

Quando os resultados dos ensaios bioquímicos convencionais das estirpes analisadas neste trabalho, que contém tanto isolados de amostras clínicas quanto do ambiente, foram comparados com os dados disponíveis na literatura clássica, observou-se que havia possibilidade de identificação errônea, como indicado a seguir.

Considerando o algoritmo para a identificação bactérias gram negativas aeróbias (SCHRECKENBERGER e LINDQUIST, 2007) do grupo BGN-NF como é o caso das espécies de *Herbaspirillum*, as estirpes AV 3926, AV 11883, AV 13384, AV 13965, AV 14040, AV 14559, AV 14775, IAM 15032, Smr1 e m4 seriam identificadas como *Burkholderia cepacia*, as estirpes IAM 14941, Z67, GSF-30 e P6-12 identificadas como *Ochobacterum spp.*, *Acidovorox spp.* ou o grupo 2 *Pseudomonas-like* e a estirpe HILT1 seria identificada como *Ralstonia monolytica*.

Estes dados mostram a dificuldade na identificação bioquímica deste grupo de bactérias, e sugere que possam estar sendo erroneamente identificadas em laboratórios clínicos como pode ser observado no artigo de Spilker e colaboradores (2008).

Uma diferença observada entre as estirpes isoladas de humanos analisadas neste trabalho é que aparentemente nenhum dos isolados clínicos é capaz de fixar nitrogênio.

6.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As dificuldades para a identificação de bactérias do gênero *Herbaspirillum* através dos ensaios convencionais mostram que a utilização dos testes moleculares é mais vantajosa e acurada, o que pode ser percebido em recentes trabalhos (TAN e OEHLER, 2005; SPILKER *et al.*, 2008 CHEN *et al.*, 2010; ZIGA *et al.*, 2010).

O sequenciamento de um fragmento de 299 pb do gene *gyrB* dos isolados humanos de *Herbaspirillum* mostram que são geneticamente relacionados entre si e à estirpe de *H. seropedicae* Smr1 com a qual apresentaram maior similaridade (tabela 4 e figura 1). O sequenciamento deste gene tem sido utilizado em estudos filogenéticos, onde têm resultado na distinção de gêneros e espécies assim como os sequenciamentos de genes *16s rRNA* (KASAI, *et al.*, 2000; YÁÑEZ *et al.*, 2003; TAYEB *et al.*, 2008).

Uma metodologia promissora para a identificação bacteriana é a espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. Trabalhos recentes têm mostrado

que através dos espectros de massa de células integras ou lisados celulares é possível distinguir vários tipos bacterianos encontrados na rotina como enterobactérias, ou outros menos frequentes como *Vibrio*, *Aeromonas*, *Francisella* (BOHME et al., 2010; SEIBOLD et al., 2010). Em alguns trabalhos foi demonstrado que o MALDI-TOF pode distinguir espécies de um mesmo gênero (MANDRELL et al., 2005; BOHME et al., 2010; SEIBOLD et al., 2010) e até mesmo subespécies (SEIBOLD et al., 2010).

Os dados da análise de MALDI-TOF (tabela 5 e Figuras 2 a 6) indicam diferenças entre as quinze estirpes analisadas. Através da análise de picos em comum, realizada utilizando o programa SPECLUST, foi possível identificar dois picos, 3349,46 (3347,97-3351,38) e 6700,78 (6697,92-6702,3), comuns às 15 bactérias do gênero *Herbaspirillum* e ausentes na estirpe de *E. coli*. Estes poderão eventualmente ser utilizados como marcadores para o gênero *Herbaspirillum*.

Foi observado um pico m/z 7313,47 (7311,92-7315,02) exclusivo para ambas as estirpes de *H. frisingense*, que poderia servir como marcador para essa espécie.

O dendrograma (figura 7) gerado a partir da análise de picos comuns classifica as bactérias analisadas em dois grupos principais. O primeiro contém a estirpe de *E. coli*, claramente diferenciada das 15 estirpes de *Herbaspirillum*, que compõem o segundo grupo.

Dois grupos principais são observados para *Herbaspirillum*, um deles formado por *H. lusitanum* e *H. hiltneri* e outro contendo as demais estirpes, distribuídas como descrito a seguir.

As estirpes de *H. seropedicae* AV 14040, Z67 e Smr1, Linhagem 2 AV 13965 e *H. rubrisubalbicans* formaram um conjunto. A associação de *Herbaspirillum* linhagem 2 com *H. seropedicae* é reforçada pela identidade de 100% no fragmento de 299 pb do gene *gyrB* daquela bactéria com a da estirpe Smr1 disponível no GenBank (numero de acesso CP002039.1) (figura1, tabela 4).

O outro conjunto contém ambas as estirpes de *H. frisingense* localizadas próximas das estirpes *H. putei* IAM 15032, *Herbaspirillum* Linhagem 1 AV 14775, *Herbaspirillum* Linhagem 3 AV 3926, *H. huttiense* IAM 14941, e as estirpes clínicas *H. putei* AV 13384 e *H. huttiense* AV 11883.

Foi possível através desta análise distinguir bactérias do gênero *Herbaspirillum* ao nível de espécie e estirpe. O MALDI-TOF é uma técnica rápida, que permite a identificação bacteriana em poucos minutos, é custo-efetiva e provou ser útil na diferenciação deste grupo de organismos. Além disso, os dados mostram que as Linhagens 1 e 3 estão próximas de *H. huttiense* e *H. putei*, dado que corrobora com os achados de SPILKER e colaboradores (2008), que relatam que uma das estirpes não identificadas até espécie apresentou elevada similaridade com as seqüências de 16S rDNA de *H. huttiense* e *H. putei*.

Risch e colaboradores (2010) compararam 204 bactérias isoladas de amostras clínicas utilizando sistemas comerciais para identificação bacteriana e os respectivos espectros de massa utilizando o espectrômetro MALDI TOF Bruker microflex. Concordância entre ambas as metodologias foi observada para 88% dos gram-negativos. Discrepâncias ocorreram em 12% das bactérias gram-negativas, na maioria dos casos ao nível de espécie; mas diferenças foram encontradas como a identificação *Enterobacter* como *Raoultella* e *Pseudomonas* como *Burkholderia*. A discrepância entre o MALDI e os sistemas microbiológicos na identificação dos gram-positivos foi 15%. Seis bactérias com resultados discrepantes entre as metodologias foram selecionadas para sequenciamento do 16S rRNA. Verificou-se que o MALDI-TOF apresentou resultados corretos até o nível de espécie em duas delas, e gênero nas outras quatro (RISCH et al., 2010), mostrando um bom desempenho na identificação de isolados clínicos.

6.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS “IN VITRO”

Embora alguns BGN-NF como *P. aeruginosa*, *B. pseudomallei* sejam patogênicos, ainda não está claro o papel de *Herbaspirillum* nas infecções (SPILKER et al., 2008). Ensaios celulares foram realizados com as estirpes de *Herbaspirillum* para verificar como essas bactérias interagem com linhagens celulares humanas.

Como a adesão é uma etapa fundamental para o estabelecimento de um patógeno no seu hospedeiro e subsequente desenvolvimento de infecção (SALYERS e WHITT, 2002), as estirpes de *Herbapirillum* foram avaliadas quanto a capacidade de aderir em células HeLa. As figuras 8 a 14 mostram que as bactérias foram capazes de aderir em células HeLa. Entretanto, além da morfologia característica de BGN, as estirpes de *Herbaspirillum* muitas vezes apresentaram estruturas pleomórficas formando longos filamentos (figuras 8B, 9A, 10B, 11B e C, 12B, 14 A e B). O seu significado ainda é desconhecido, mas não se pode excluir que estejam associados ao processo de divisão celular (Rothballer et al., 2006).

Não foi possível relacionar o perfil de adesão das estirpes à nenhum dos padrões descritos até o momento para *E. coli*, como adesão localizada, agregativa, difusa (SCALETSKI et al., 1999). Em algumas células foram observadas bactérias isoladas, em outras formando linhas, ou pequenos grupos.

A presença de bactérias aderidas foi observada em apenas 20 a 30% das células. Isso pode ter ocorrido por várias razões, incluindo a concentração de bactérias no experimento, uma vez que foram utilizadas as condições padronizadas (Scaletski et al. 1984, 1999) para identificar estirpes enteropatogênicas de *E. coli*; também pode ter sido devido a presença de manose no meio, uma vez que o ensaio utilizado foi desenvolvido para a detecção de adesinas manose-resistentes associadas aos patótipos de *E. coli* (SCALETSKI et al., 1984 SCALETSKI et al. 1999) o que pode ter reduzido a adesão celular dos *Herbaspirillum* às células HeLa devido a ligação da manose às adesinas; ou ainda devido ao baixo número de receptores reconhecidos pelas adesinas de *Herbaspirillum* em células HeLa.

Foram observadas, em um baixo número de células HeLa, discretas alterações que poderiam sugerir um possível efeito tóxico das bactérias. Isto ocorreu em células incubadas com a Linhagem 3 AV 3926, *H. huttiense* AV 11883, *H. frisingense* AV 14559 e GSF-30, *H. rubrisubalbicans* M4, *H. seropedicae* estirpe Z67, mas em uma pequena proporção das células. Novos ensaios devem ser realizados para confirmar esse achado.

Além da adesão, outra característica comum entre os patógenos é a produção de toxinas que causam danos aos tecidos do hospedeiro

(SALYERS e WHITT, 2002). Nenhum efeito citotóxico foi observado em células Vero, (figura 15) contudo novos ensaios devem ser realizados com tempos maiores de incubação e também com maiores concentrações de bactérias para confirmar esse resultado.

O ensaio de hemólise visa detectar a atividade de hemolisinas, um grupo heterogêneo de toxinas produzidas por vários tipos de patógenos, capazes de lisar eritrócitos e outras células de mamíferos. Entretanto os organismos variam em relação a sua produção, enquanto alguns produzem hemolisina apenas durante a fase logarítmica de crescimento, outras o fazem apenas na fase estacionária, e em algumas bactérias a síntese da hemolisina ocorre em momentos específicos gerando picos de produção que logo são reprimidos (SCHEFFER et al., 1988). A atividade hemolítica de *Herbaspirillum* foi avaliada durante os períodos de 6, 12 e 24 horas (figura 16 e 17) e resultados negativos foram observados para todas as estirpes em todos os períodos avaliados.

Os resultados dos ensaios celulares “in vitro” sugerem que as bactérias analisadas apresentam baixo potencial de virulência.

7. CONCLUSÕES

- Os ensaios microbiológicos convencionais podem levar a identificação errônea de *Herbaspirillum* como *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia monolytica*, *Ochobacterum spp.*, *Acidovorox spp.* ou o grupo 2 *Pseudomonas*-like.
- Os resultados deste trabalho mostram maior diversidade entre as bactérias do gênero *Herbaspirillum* conflitando com dados disponíveis nos livros textos de microbiologia clínica, baseados apenas em *Herbaspirillum* species 3. Entre as reações conflitantes estão a Polimixina B (a maioria é resistente), catalase (variável), crescimento a 42°C (variável).
- Foram observadas algumas discrepâncias nos resultados dos testes em comum nos ensaios microbiológicos convencionais e o sistema Biolog.
- Nenhum dos isolados clínicos demonstrou a capacidade de fixar nitrogênio nas condições utilizadas neste trabalho.
- A sequência parcial do gene *gyrB* confirma que as estirpes isoladas de humanos são geneticamente relacionadas, e que apresentam homologia entre 93 a 100% com *gyrB* de *H. seropedicae*.
- As análises de espectrometria de massa tipo MALDI-TOF permitiram uma clara distinção entre *E. coli* e *Herbaspirillum*, que foram diferenciados entre si ao nível de espécie e até mesmo estirpe, o que não foi possível com os ensaios microbiológicos.
- As 15 estirpes de *Herbaspirillum* spp apresentaram a capacidade de aderir em células HeLa.
- Não foram observadas atividades hemolítica e citotóxica em nenhuma das bactérias analisadas, sugerindo que as estirpes de *Herbaspirillum* são oportunistas que apresentam baixo grau de virulência.

REFERÊNCIAS

- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. and RAOULT, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in Microbiology**. v. 17, n. 1, p.37-45, 2008.
- ALBUQUERQUE, P.; MENDES, M. V.; SANTOS, C. L.; FERREIRA, P. M.; TAVARES, F. DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. **Science of the total environment**. v. 407, p. 3641-3651, 2009.
- ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNO, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNER, M.; HAKKINEN, J. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. **Journal of proteome research**, v. 5, p. 785-792, 2006.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T. de; BODDEY R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 3, p. 449-456, 2006.
- ARAGNO, M. and SCHLEGEL, H. G. *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, p.112–116, 1978.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ASLANZADEH, J. Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. In: TANG, Y. and STRATTON, C., W. **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology**. New York: Springer US, 2006. p.84-116. disponível em: Springer-Link Protocols –www.springerlink.com.
- BAIS, H., P.; WEIR, T., L.; PERRY, L., G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**. v. 57, p. 2333-266, 2006.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. Nov., a root-associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v.13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labeled fertilizer. 202. **International Symposium on Sustainable Agriculture for the tropics - The role of Biological Nitrogen Fixation**, Angra dos Reis, 1995.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802–810, 1996.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (Annals of the Brazilian Academy of Sciences), v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI V. L. D.; DÖBEREINER, J. In: GARRITY, G. M. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology., New York, USA: Springer, v.2 parte, p.629-636, 2005

BARKEN, K. B.; HAAGENSEN, J. A. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. **Clinica Chimica Acta**. v. 384, p. 1-11, 2007.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673–1685, 2005.

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J., GREUB, G. PROD'HOM, G. Performace of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiolgy**, v. 48, n. 5, p. 1549-1554, 2010.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1614-1619, 2010.

BÜTTNER, D.; and BONAS, U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 312 – 319, 2003.

CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; FAVARI, F.; CARIANI, L.; SCIACCA, A.; SAVOIA, D.; COLLURA, A.; FISCARELLI, E.; DE INTINIS, G.; BUSETTI, M.; CIPOLLONI, A.; D'APRILE, A.; PROVENZANO, E.; COLLEBRUSCO, I.; FRONTINI, P.; STASSI, G.; TRANCASSINI, M.; TOVAGLIARI, D.; LAVITOLA, A.; DOHERTY, C. J.; COENYE, T.; GOVAN, J. R. W.; VANDAMME, P. Transmission of *Burkholderia*

cepacia Complex: Evidence for New Epidemic Clones Infecting Cystic Fibrosis Patients in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.10, p. 5136–5142, 2005.

CHAPIN, K. C.; LAUDERDALE, T. L., Reagents, Stains and Media Bacteriology. Cap. 27, p. 354-383 In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Vol.1. ASM Press, Washington., 2003.

CHEN, J.; SU, Z.; LIU, Y; SANDOGHCAN, S.; ZHENG, D.; WANG, S.; XU, H. *Herbaspirillum* Species: A potential Pathogenic Bacteria Isolated from Acute Lymphoblastic Leukemia Patient. **Current Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2062–2069, 2010.

COENYE, T. ; GORIS, J.; SPILKER, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2062–2069, 2002.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 31, n.127(2), p. 285-294, 1966.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2223–2230, 2004.

DIXON, R.; EADY, R. R.; ESPIN, G.; HILL, S.; IACCARINO, M.; KAHN, D.; MERRICK, M. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. **Nature**, v. 286, p.128-132, 1980.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Reviews/Microbiology**, v.2, p.621-631, 2004.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v.44, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Ano 1, n. 1, 1997. disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/> acesso em 20 de setembro de 2009

DOBRITSA, A., P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1418-1426, 2010.

EHRlich, G.,D.; HILLER, N., L. and HU, F. Z. What makes pathogens pathogenic. **Genome Biology**, v. 9, p. 225.1- 225. 7, 2008.

EUZÉBY, J. P. M. LPSN- List of prokariotic names with Standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cit.fr/h/herbaspirillum.html>. Acesso em: 18 de Janeiro de 2011.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common Themes in Microbial Pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v.53 , p. 210-230, 1989.

FRANCO, C. F.; MELLADO, M. C. M.; ALVES, P. M.; COELHO, A. V. Monitoring virus-like particle and viral protein production by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. **Talanta**, v. 80, p. 1561-1568, 2010.

GOMILA, M.; GASCÓ, J.; BUSQUETS, A.; GIL, J.; BERNABEU, R.; BUADES, J. M.; LALUCAT, J. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 103–108, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v.41, p.95-98, 1999.

HUANG, W., M. Bacterial diversity based on type II DNA Topoisomerase genes. **Annual Reviews Genet.**, v. 30, p. 79-107, 1996.

IM, W.-T.; BAE, H.-S.; YOKOTA, A.; LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. Nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 851-855, 2004.

JAMNINES, G. and DE VOS, D. A Review of Current and Future Molecular Diagnostic Test for Use in the Microbiology Laboratory. In: O'CONNOR, L. **Methods in Molecular Biology - Diagnostic Bacteriology**. Totowa: Humana Press, V. 345, Ed. 2, 2006 p.1-21 disponível em: Springer-Link Protocols –www.springerlink.com.

JANDA, M., J.; and ABBOTT, S., L. Bacterial Identification for Publication: When is Enough Enough? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p.1887-1891, 2002.

JAMES, E., K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, na endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 785-797, 1997.

JUNG, S.-Y.; LEE, M.-H.; OH, T.-K.; YOON, J.-H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victoriakis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.2284-2288, 2007.

KASAI, H.; EZAKI, T. and HARAYAMA, S. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their gyrB Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 301-308, 2000.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 887-891, 1997.

LAY, J., O., Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, p. 172-194, 2001.

LAY, J., O., Jr. and HOLLAND, R. Rapid Identification of Bacteria Bases on Spectral Patterns Using MALDI-TOFMS In: CHAPMAN, J. R. **Methods in Molecular Biology – Mass Spectrometry of Proteins and Peptides**. Totowa: Humana Press, V. 146, 2000 p.461-487 disponível em: Springer-Link Protocols –www.springerlink.com.

LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 12, n. 4, p. 161-170, 1962.

MACFADDIN, J. F.; **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MANDRELL, R. E.; HARDEN, L. A.; BATES, A.; MILLER, W. G.; HADDON, W. F.; FAGERQUIST, C. K. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 71, N.10, P. 6292-6307, 2005.

MERRICK, M. J. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-living and Symbiotic Bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman: Hall, New York, p.835-876. 1992.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURRAY, P., R., BARON, E., J., JORGENSEN, J., H., PFALLER, M., A., YOLKEN, R., H., **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D. C.: ASM Press, 2003.

NEHL, D., B. and KNOX, O., G., G. Significance of Bacteria in the Rhizosphere In: MUKERJI, K.; MANOHARACHARY, C. and SINGH, J. **Soil Biology: Microbial Activity in the Rhizosphere**. Berlin: Springer, 2006. p.89-119. disponível em: Springer-Book Series –www.springerlink.com.

NOCKER, A.; BURR, M. and CAMPER, A., K. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. **Microbial Ecology**, v. 54, p.276-289, 2007.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-açúcar. **Fitopatogenos**, v. 18, p.313, 1993.

PEDROSA, F. O.; YATES, G. M. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilienses* by *nifA* and *nifC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.23. p.95-101, 1984.

PEDROSA, F. O. Fixação Biológica de Nitrogênio: Fértil Idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E. M.; MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. I.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biology e Biochemistry**, v.29, n. 5/6, p. 843-846, 1997.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; SYEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.189-195, 2001.

POPE, M. R.; MURREL, S. A and LUDDEN P. W. Covalent modification of the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine diphosphoribosylation

of a specific arginyl residue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 86, n.10, p.3173-3177, 1985.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982a.

RISCH, M.; RADJENOVIC, D.; HAN, J. N.; WYDLER, M.; NYDEGGER, L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. **Swiss Med Wkly**, doi:10.4414/smw.2010.13095, 2010.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p.275-284, 2006.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A (2006). *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 1341–1348, 2006.

ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.; SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S.; HARTMANN, A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 85-95, 2008.

SALTERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis. A molecular approach**. 2.ed. ASM press, Washington, 2002. 539p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; KOSTRZEWA, M.; GLEIDER, K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **Plos one**. v. 3, n. 7, p. 1-10, 2008.

SCALETSKI, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**. v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALETSKI, I. C.; PEDROSO, M. Z.; SILVA, R. M. Phenotypic and genetic features of *Escherichia coli* strains showing simultaneous expression of localized and diffuse adherence. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 23. p. 181-188, 1999.

SCHEFFER, J.; KONIG, W.; BRAUN, V.; GOEBEL, W. Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, p. 544 – 551, 1988.

SCHRECKENBERGER, P. C.; LINDQUIST, D. Algorithms for identification of aerobic gram-negative bacteria. Cap 24. P.371-376. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Vol.1. ASM Press, Washington., 2007.

SCHRECKENBERGER, P. C.; DANESHVAR, M. I.; HOLLIS, D. G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. Cap 50, p. 770 – 802. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Vol.1. ASM Press, Washington., 2007.

SEIBOLD, E.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; ZEMAN, E.; SPLETTSTOESSER, W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.1061-1069, 2010.

SILVA, R. M. da; CAUGANT, D. A.; ERIBE, E. R. K.; AAS, J. A.; LINGAAS, P. S.; GEIRAN, O.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 44, n. 5, p. 1055 – 1060, 2006.

SILVEIRA, J. M. F. J, da; DAL POZ, M. E.; FONSECA, M. da G. D.; BORGES, I. C.; MELO, M. F. Evolução recente da biotecnologia no Brasil. **Texto para Discussão. IE/UNICAMP**, n. 114, fev. 2004.

SILVEIRA, A., P., D. da; FREITAS, S. dos S. **Microbiota do solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007.

SPIPKER, T.; ULUER, A. Z.; MARTY, F. M.; YEH, W. W.; LEVISON, J. H.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Recovery of *Herbaspirillum* Species from Persons with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2774-2777, 2008.

TAN, M. J.; OEHLER, R. L. Lower extremity cellulitis and bacteremia with *Herbaspirillum seropedicae* associated with aquatic exposure in a patient with cirrhosis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 13, n. 5, p. 277-279, 2005.

TAYEB, L., A.; LEFEVRE, M.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; GRIMONT, P. A. D. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 169-177, 2008.

TONOLLA, M.; BENAGLI, C.; ROSSI, V.; FRAGOSO, C.; PETRINI, O. MALDI-TOF/MS: A new laboratory option for the diagnosis of clinical infections. **Pipette Swiss laboratory medicine**, v. 3, p. 6-10, 2010.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TYLER, H. L. and TRIPLETT, E. W. Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 53-73, 2008.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Internacional journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN BERKUM, P. & BOHLOOL, B. B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. **Microbiological Reviews**, v.44, p. 491-517, 1980.

VITOUSEK, P. M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C. B.; GRIMM, N. B.; HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E. B.; SPRENT J. I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 57/58, p.1-45, 2002.

WEYANT, R. S.; MOSS W.C.; WEAVER, R.E.; HOLLIS, D.G.; JORDAN, J.G.; COOK, E.C.; DANESHVAR, M.I.; Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and facultatively anaerobic bacteria. 2.ed. Williams & Wilkins, 1996.

WINN, W.J.; STEPHEN, A.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHERECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6.ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2006. Cap. 7 The nonfermentative gram-negative bacilli, p.303-391.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. v. 52, p.487-511, 2001.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

YAMADA, S.; OHASHI, E.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and Their Application to the Detection of *B. cereus* in Rice. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n. 4, p.1483-1490, 1999.

YÁÑEZ, M. A.; CATALÁN, V.; APRÁIZ, D.; FIGUERAS, M., J., MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p. 875-883, 2003.

ZIGA, E., D.; DRULEY, T.; BURNHAM, C., A., D. *Herbaspirillum* Species Bacteremia in Pediatric Oncology Patient. **Journal of Clinical Microbiology**. V.48, n. 11, p. 4320-4321, 2010.